



“Desarrollo de biomateriales como sistemas de liberación locales para el tratamiento de enfermedades orales”

Doctorando: Bioquímica Alvarez Echazú, María Inés

Director: Prof. Dr. Desimone, Martín Federico

Directora adjunta: Dra. Alvarez, Gisela Solange

Área del doctorado: Farmacia y Bioquímica

Subárea: Ciencias Farmacéuticas

Lugar de trabajo: Cátedra Química Analítica Instrumental, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Tesis para optar por el título de Doctor de la Universidad De Buenos Aires

Año 2018

Agradecimientos

A mi familia, mis amigos y compañeros de trabajo que hicieron posible la realización de la tesis. Pero especialmente a mis bombones Homero, Dobby y Hulky.

El desarrollo del presente trabajo de tesis en conjunto con los integrantes del grupo de investigación permitió dar lugar a las siguientes publicaciones:

- Alvarez Echazú MI, Olivetti CE, Peralta I, Alonso R, Anesini C, Perez, C.J., Alvarez GS, Desimone MF. Development of pH-responsive biopolymer-silica composites loaded with *Larrea divaricata* Cav. extract with antioxidant activity. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2018, 169,82-91
- Echazú, M.I., Olivetti C.E., Anesini, C., Perez, C.J., Alvarez G.S., Desimone M.F.: Development and Evaluation of Thymol-Chitosan Hydrogels with Antimicrobial-Antioxidant Activity for Oral Local Delivery, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 81, 588–96.
- Echazú, M.I., Tuttolomondo, M. V., Foglia M. L., Mebert, A. M., Alvarez, G. S., Desimone, M. F: Advances in collagen, chitosan and silica biomaterials for oral tissue regeneration: from basics to clinical trials. *J. Mater. Chem. B*, 2016, 4, 6913-6929
- Mebert, A. M., Tuttolomondo, M. V., Echazú, M. I. A., Foglia, M. L., Alvarez, G. S., Vescina, M. C., Santo-Orihuela, P. L. and Desimone, M. F. (2016), Nanoparticles and capillary electrophoresis: A marriage with environmental impact. *ELECTROPHORESIS*. 2016; 37(15-16):2196-207.
- Alvarez GS, Echazu MI, Bertinatto JA, Catalano PN, Copello GJ, Foglia ML, Gonzalez JA, Giorgieri SA, Iglesias SL, Mebert AM, Santo-Orihuela PL, Tuttolomondo MV, Villanueva EE, Desimone MF: Innovative Immobilization Matrices. *Curr Pharm Biotechnol*. 2016; 17(5):439-48.
- Alvarez GS, Echazu MI, Olivetti CE, Desimone MF: Synthesis and characterization of ibandronate-loaded silica nanoparticles and collagen nanocomposites. *Curr Pharm Biotechnol*. 2015; 16(7):661-7.

Contenido

CAPÍTULO 1:.....	8
INTRODUCCIÓN.....	8
La mucosa oral y el tejido periodontal	11
Respuestas inmune e inflamatoria en los tejidos orales	13
Enfermedad periodontal	15
Biomateriales en la salud oral	16
Colágeno.....	16
Quitosano.....	19
Sílica	22
Objetivos específicos	26
CAPÍTULO 2:.....	27
SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA CARGADAS CON IBANDRONATO Y SUS COMPÓSITOS CON COLÁGENO	27
1.Introducción	28
2. Materiales y métodos	30
2.1. Síntesis de nanopartículas.....	30
2.2. Caracterización de nanopartículas: área superficial, morfología y distribución de tamaño	31
2.3. Isotermas de adsorción para NPs de sílica con ibandronato de sodio	32
2.4. Método de electroforesis capilar	32
2.5. Determinación de los perfiles de liberación en nanopartículas con ibandronato <i>in</i> <i>vitro</i>	33
2.6. Síntesis y caracterización de los compósitos de sílica-colágeno.....	33
2.7. Cultivo de células y experimentos de toxicidad <i>in vitro</i>	34
2.8. Diferenciación de células mesenquimales	34
2.9. Análisis estadístico	35
3. Resultados y discusión	35
3.1. Caracterización de partículas	35
3.2. Incorporación de ibandronato de sodio en nanopartículas y liberación del fármaco <i>in vitro</i>	36
3.3. Síntesis y caracterización de compósitos: liberación <i>in vitro</i>	38
3.4. Ensayo de toxicidad y diferenciación celular mesenquimal	39
CAPÍTULO 3:.....	43
DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE HIDROGELES DE TIMOL-QUITOSANO CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA-ANTIOXIDANTE PARA LA ADMINISTRACIÓN LOCAL ORAL	43
1. Introducción	44

2. Experimental.....	46
2.1. Reactivos y materiales.....	46
2.2. Síntesis del hidrogel de quitosano.....	47
2.3. Caracterización ultraestructural del hidrogel de quitosano.....	47
2.4. Caracterización por FT-IR.....	47
2.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	48
2.5 Perfil de hinchamiento.....	48
2.7. Medidas reológicas.....	48
2.8. Biodegradabilidad del quitosano.....	48
2.9. Prueba de viabilidad y cultivo celular.....	49
2.10. Carga y liberación de timol.....	49
2.11. Prueba de viabilidad de células bacterianas.....	50
2.12. Prueba de actividad antimicrobiana.....	50
2.13. Actividad antioxidante.....	51
2.14. Análisis estadístico.....	52
3. Resultados y discusión.....	52
3.1. Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano.....	52
3.2. Estudios de biocompatibilidad con hidrogeles de quitosano y estudios de liberación de timol.....	57
3.3. Viabilidad de células bacterianas en hidrogeles de quitosano y estudios de la actividad antimicrobiana.....	59
3.4. Estudios de actividad antioxidante de los hidrogeles de quitosano.....	63
4. Conclusiones.....	65
CAPÍTULO 4:.....	67
DESARROLLO DE COMPÓSITOS DE BIOPOLÍMERO-SÍLICA SENSIBLES AL pH CARGADOS CON EXTRACTO DE <i>LARREA DIVARICATA</i> CAV. CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	67
1. Introducción.....	68
2. Materiales y métodos.....	70
2.1. Materiales.....	70
2.2. Material vegetal y extracto.....	70
2.3. Síntesis de compósitos.....	71
2.4. Caracterización ultraestructural.....	71
2.5. Caracterización por FT-IR.....	71
2.6. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	71
2.7. Mediciones reológicas.....	72
2.8. Estudios de hinchamiento.....	72
2.9. Biodegradabilidad de los compósitos.....	72

2.10. Incorporación y liberación de <i>Larrea divaricata</i> Cav.	73
2.11. Actividad antioxidante.....	73
2.12. Bioactividad <i>in vitro</i>	74
2.13. Citotoxicidad.....	74
2.14. El análisis estadístico.....	75
3. Resultados y discusión.....	75
3.1. Síntesis y caracterización de compósitos.....	75
3.2. Estudio de la actividad antioxidante de los compósitos.....	85
3.3. Bioactividad y estudios de citotoxicidad de los compósitos.....	87
4. Conclusiones.....	89
CAPÍTULO 5:.....	91
DESARROLLO DE HIDROGELES DE QUITOSANO MODIFICADOS con DDSA Y SU ESTUDIO PRELIMINAR <i>IN VIVO</i>	91
1.Introducción.....	92
2. Materiales y métodos.....	93
2.1 Materiales.....	93
2.2. Síntesis de hidrogeles DDSA-quitosano.....	94
2.3. Caracterización ultraestructural por SEM.....	94
2.4. Caracterización por FT-IR y ¹³ C RMN.....	94
2.5. Medidas reológicas.....	95
2.6. Incorporación y liberación de timol.....	95
2.7. Prueba de actividad antimicrobiana.....	95
2.8. Actividad antioxidante.....	96
2.9. Prueba de viabilidad y cultivo celular.....	96
2.10. Evaluación <i>in vivo</i>	97
2.11. Análisis estadístico.....	98
3. Resultados y discusión.....	99
3.1. Síntesis y caracterización de hidrogeles DDSA-quitosano.....	99
3.2. Estudios de incorporación y liberación de timol a partir de hidrogeles de DDSA- quitosano.....	103
3.3. Estudio antimicrobiano de los hidrogeles DDSA-quitosano.....	104
3.4. Estudio antioxidante de los hidrogeles DDSA-quitosano.....	105
3.5. Estudios de citocompatibilidad y evaluación preliminar <i>in vivo</i> de los hidrogeles DDSA-quitosano.....	106
4. Conclusiones.....	110
CAPÍTULO 6:.....	111
CONCLUSIONES GENERALES.....	111

CAPÍTULO 7:.....	116
REFERENCIAS	116
CAPÍTULO 8:.....	145
APÉNDICE	145
Resumen de 200 palabras en inglés	146
Resumen de 200 palabras en castellano	146
Resumen de 900 palabras en castellano	147

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

El trabajo desarrollado durante la tesis doctoral se centra en la aplicación de biomateriales en la mucosa oral y los tejidos soporte de los dientes. Para cumplir con este propósito, las particularidades y componentes de cada uno de estos tejidos fueron minuciosamente considerados. Asimismo, las características de los biomateriales desarrollados fueron cuidadosamente analizadas.

En este sentido, vale la pena destacar que la mucosa oral no ha recibido suficiente atención debido a la baja morbilidad asociada a los procesos patológicos que la afectan. Sin embargo, el impacto psicológico de una enfermedad subyacente en la calidad de vida de los pacientes no debe dejarse de lado. Por ejemplo, la enfermedad periodontal y sus consecuencias, que incluyen la movilidad de los dientes, la recesión gingival y el mal aliento, están relacionados con una disminución en la calidad de vida [1].

Un estudio realizado por Fisher y colaboradores mostró un aumento en la calidad de vida de 61 pacientes con enfermedad periodontal que fueron sometidos a procedimientos de implantes [2]. La enfermedad de los tejidos blandos de la cavidad oral está frecuentemente relacionada con la pérdida ósea alveolar, que en última instancia conduce a la pérdida de dientes, un proceso que no puede ser revertido. Además, los implantes dentales podrían potencialmente mejorar los aspectos estéticos y funcionales del diente ausente, pero el procedimiento no siempre está relacionado con el éxito y en muchos casos ocurren rechazos de implantes.

Hasta el momento, ningún modelo ha sido capaz de recrear completamente los aspectos anatómicos, fisiológicos, el entorno biomecánico y funcional de la boca y la mandíbula del ser humano [3]. Como consecuencia, una comprensión completa de la estructura y función de la mucosa oral y de los tejidos soporte de los dientes, las patologías subyacentes que los afectan y los tratamientos disponibles son necesarios para el diseño de biomateriales destinados a resolver los problemas asociados con estas patologías.

Hoy en día, el desarrollo de dispositivos innovadores para la administración de fármacos se centra en prevención de los efectos secundarios y el aumento de los intervalos de dosificación. Particularmente, el desarrollo de nuevos sistemas de administración tópica para mucosas de agentes antimicrobianos y antioxidantes de origen natural tiene un desarrollo creciente, ya que son de fácil administración, previenen efectos secundarios y se puede lograr la dosis adecuada de bioactivos

en el tejido mucoso (**Figura 1**) [4,5]. Por ejemplo, los extractos de *Punica granatum L.* y *Matricaria recutita L.* han demostrado ser eficaces para reducir el sangrado gingival en la enfermedad periodontal, sugiriendo que agentes terapéuticos de origen natural podrían actuar en el restablecimiento y mantenimiento de la salud periodontal [6].

Existen marcadas diferencias entre las mucosas y la piel que influyen en el diseño de nuevos sistemas de liberación. Las mucosas no poseen una capa externa queratinizada como la piel, por lo tanto, son mucho más sensibles a sustancias irritantes. Sin embargo, tienen un buen perfil de permeabilidad, convirtiéndola en un sitio adecuado para la administración de fármacos [7]. Por ello, el empleo de biomateriales biocompatibles como el quitosano y el colágeno son de suma utilidad. Por un lado, el quitosano es un biopolímero que, además de ser biocompatible tiene propiedades mucoadhesivas [8]. *La mucoadhesividad es clave para el diseño de nuevos sistemas de liberación para mucosas, ya que da lugar a la administración del fármaco de forma más espaciada* [9]. La cavidad oral es un ambiente con un alto porcentaje de humedad con secreciones naturales como la saliva que tienden a diluir los fármacos, con lo cual para lograr una acción continua se requieren múltiples aplicaciones. Por otra parte, el colágeno puede imitar muchas características de la matriz extracelular, otorgándole propiedades quimiotácticas fibroblásticas. Los fibroblastos son responsables de la síntesis de colágeno, glicosaminoglicanos y otros componentes de la matriz. Por lo tanto, tienen un papel importante en la regeneración de tejidos blandos.

A su vez, en la actualidad no solamente es importante el uso de materiales biocompatibles, sino que también presenten bioactividad. Los materiales bioactivos como la sílica mejoran el crecimiento de las células óseas y la deposición ósea. Por lo tanto, puede proporcionar un andamio para la migración celular y la formación rápida de tejido óseo [10]. La sílica puede utilizarse bajo la forma de nanopartículas, de manera tal que actúe como un carrier para fármacos y que pueda participar en la mineralización ósea. La regeneración de nuevo tejido óseo cobra importancia en enfermedades gingivoperiodontales, en donde no solo el daño compromete a la mucosa oral, sino también al tejido óseo alveolar. Las sustancias producidas por la flora bacteriana subgingival y los tejidos durante la inflamación y las reacciones inmunitarias alteran el recambio óseo: ya sea por diferenciación o estimulación de osteoclastos o por la inhibición de la formación ósea por osteoblastos. En ese

sentido, la utilización de fármacos como el ibandronato, que es un bifosfonato que inhibe la resorción ósea mediada por los osteoclastos incorporado en un sistema de liberación local podría ayudar a la regeneración del tejido óseo perdido en la enfermedad periodontal.

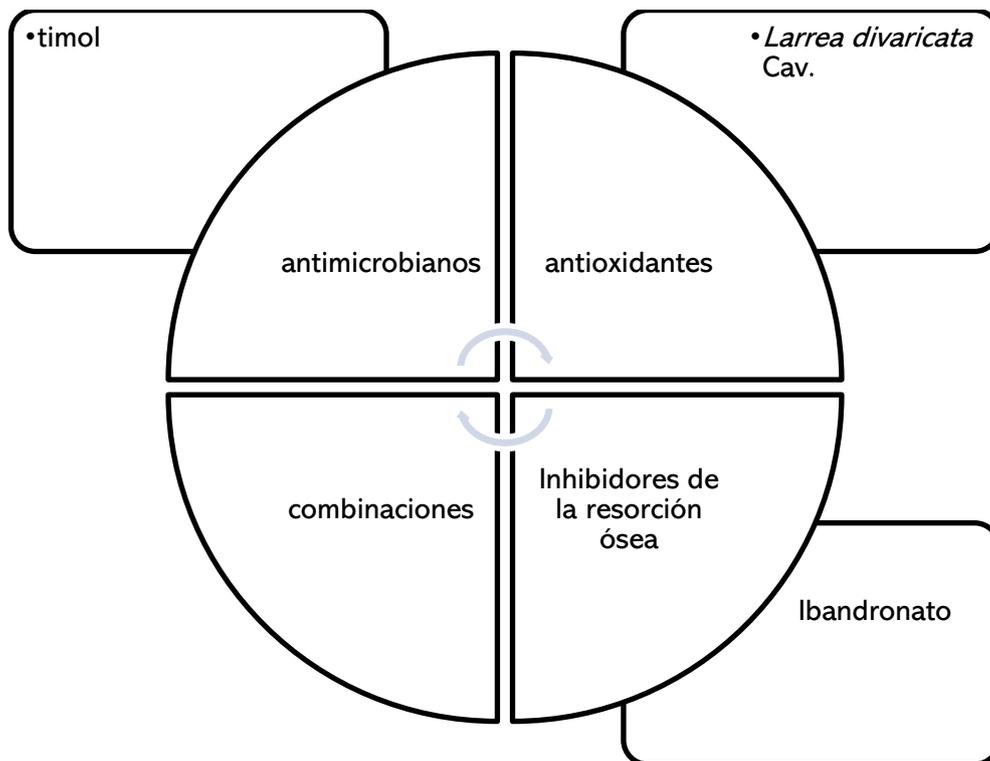


Figura 1. Propiedades y ejemplos de nuevos sistemas de administración tópica en mucosas para el tratamiento de la enfermedad periodontal

La mucosa oral y el tejido periodontal

Mucho se sabe sobre la fisiología y la estructura de la piel. La mucosa oral no es muy diferente de la piel, aunque tiene algunas particularidades que la hacen única. Para empezar, una característica digna de mencionar es su capacidad de sanar sin cicatriz y a una velocidad más rápida que la piel lesionada. La diferencia en la expresión de algunos componentes de la matriz extracelular tales como el procolágeno I y la tenascina-C, así como la presencia reducida de células inmunitarias y mediadores profibróticos inducidos por la tolerancia oral, puede ser responsable de ello [11].

Histológicamente, la mucosa oral se compone de una capa epitelial escamosa estratificada, una lámina basal, una lámina propia y una capa submucosa, esta última

en contacto con el hueso o con músculo dependiendo del área (Figura 2). La queratinización de la capa epitelial proporciona una protección adicional contra las fuerzas mecánicas asociadas con la masticación como es el caso del paladar duro y la encía. Por otro lado, cuando se requiere más flexibilidad, el epitelio permanece sin queratinizar [12]. Además, es interesante observar que el epitelio de la mucosa es más grueso que el de la piel y su espesor se ha relacionado positivamente con un mayor flujo sanguíneo, probablemente debido a una mayor demanda metabólica [13].

La mucosa de la cavidad bucal se puede dividir en la mucosa gingival, que se encuentra en el paladar duro y la encía, la mucosa de revestimiento, que se observa en los labios, mejillas, paladar blando y finalmente, la mucosa especializada, constituida por papilas linguales y corpúsculos gustativos. La mucosa gingival, junto con el epitelio de unión constituye el tejido gingival, que está firmemente unido al hueso alveolar y a los dientes. Este tejido gingival, junto con ligamentos periodontales y el hueso alveolar proporciona el apoyo necesario para los dientes.

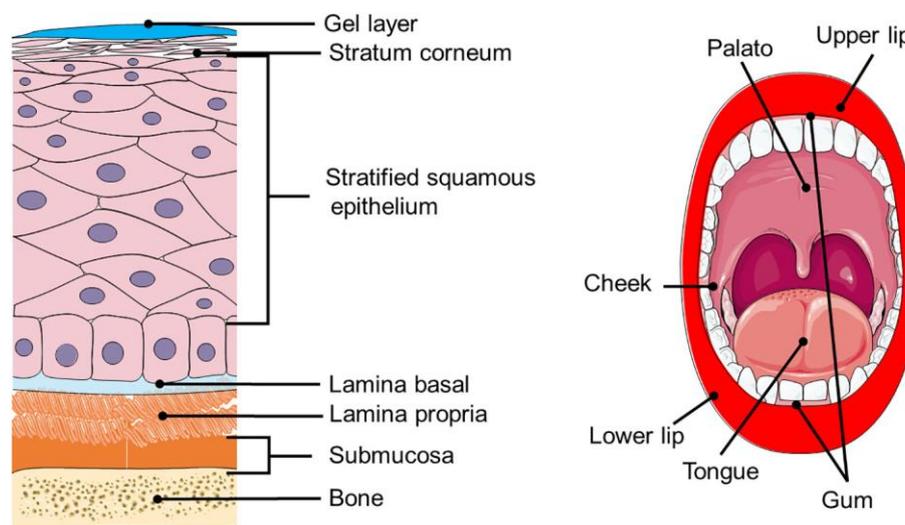


Figura 2. Representación esquemática de la histología de la cavidad oral y de la mucosa bucal. "Reimpreso de ref. [14]. Derechos de autor (2018) con el permiso por Elsevier"

El periodonto, que en latín significa "alrededor del diente" no solo se refiere a la mucosa gingival sino también al cemento, ligamento periodontal y al hueso alveolar. La presencia de glándulas salivales explica otra característica de la cavidad oral: la presencia de saliva, en mucha cantidad en toda la superficie de la mucosa. La saliva

es una secreción compleja, incluso a pesar de que se compone de 99% de agua y 1% de una variedad de moléculas orgánicas e inorgánicas que tienen como función mantener la salud bucal, en general mediante protección antimicrobiana, lubricación, dilución y efecto buffer [15,16]. Entre los compuestos orgánicos, se pueden encontrar glicoproteínas, enzimas, inmunoglobulinas y algunos péptidos con actividad antimicrobiana. Por otro lado, la fracción inorgánica contiene sodio, potasio, cloruro y bicarbonato en concentraciones que hacen que la saliva sea hipotónica cuando se compara con otros fluidos corporales [17]. La saliva en sí misma, así como las secreciones gingivales, proporcionan los nutrientes de la microbiota que coloniza la mucosa oral, cuyos miembros pueden cambiar debido a hábitos dietéticos y enfermedades subyacentes [18].

Respuestas inmune e inflamatoria en los tejidos orales

La mucosa oral es una barrera física para los patógenos y otros agentes ambientales nocivos. Las células inmunes innatas como los macrófagos, leucocitos polimorfonucleares y mediadores inmunoinflamatorios tienen un importante papel en la respuesta inmune oral. Sin embargo, los mediadores biológicos derivados de los queratinocitos orales, la inmunoglobulina secretora de saliva A y los componentes del fluido crevicular gingival también son relevantes en la comprensión de la inmunidad de la mucosa de la cavidad oral. La inmunidad de la mucosa de la cavidad oral tiene la intención de limitar la colonización de microorganismos patógenos, generar respuestas inmunoinflamatorias contra patógenos y la tolerancia de los microorganismos comensales [19].

Si se lesiona la mucosa, se pueden observar tres etapas distintas, pero superpuestas: (i) inflamación, (ii) proliferación y (iii) remodelación. La inflamación tiene lugar en una cuestión de minutos e implica la activación de la cascada de coagulación y el sistema inmune en un intento de detener el sangrado, prevenir la infección y eliminar los restos celulares. La activación plaquetaria ocurre cuando la capa endotelial se interrumpe y el colágeno desde la matriz subyacente se expone. El colágeno interactúa con las plaquetas y el factor von Willebrand para inducir la activación de la cascada de coagulación, lo que lleva a la formación de una malla de fibrina que constituye el tapón de plaquetas, que sirve como andamio para las células migratorias y evita un sangrado adicional, *en la hemostasia* [20]. Los neutrófilos son las primeras células en llegar al sitio lesionado ya que su

reclutamiento es iniciado por cambios en el endotelio en respuesta a los mediadores de la inflamación. A pesar de su naturaleza proinflamatoria, los neutrófilos pueden desempeñar un papel importante en la curación mediante la eliminación de las células muertas y bacterias, que podrían perpetuar la respuesta inflamatoria en el tiempo. Además, los neutrófilos secretan diversas proteasas como la metaloproteinasa 9 de matriz (MMP9), una enzima que a su vez activa el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) para promover la revascularización del sitio lesionado, así como varias señales que conducen al reclutamiento de monocitos y su extravasación al área herida. Los monocitos reclutados se activan y son responsables de la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos y materiales extraños [21]. Por otra parte, los macrófagos son algunas de las células más importantes presentes en las últimas etapas del proceso inflamatorio (48-72 horas), responsables de la progresión a la fase proliferativa. Durante la etapa de proliferación, que dura hasta 2 semanas, los fibroblastos son reclutados y estimulados para proliferar junto con el surgimiento de nuevos vasos sanguíneos, llevando a la formación de un tejido altamente vascularizado [22]. Además, los fibroblastos se diferencian en miofibroblastos y promueven la contracción de la herida. Finalmente, la última etapa, se alcanza con la fase de remodelación, durante la cual se produce un nuevo colágeno depositado y remodelado para restaurar la arquitectura de tejido normal. Otra característica interesante del proceso de curación en la mucosa oral es el resultado final, ya que las heridas tienden a sanar sin cicatriz, similar a lo que ocurre en la piel del feto, un proceso que se lo ha asociado con la expresión diferencial de ciertos componentes de la matriz extracelular. Por ejemplo, la fibronectina, la fibronectina ED-A y el condroitin sulfato son expresados en mayor proporción en la mucosa oral en comparación con la piel [23]. Un patrón similar a lo encontrado en un estudio previo en donde se compararon piel humana fetal y adulta [24]. Además, las heridas orales muestran un menor número de células inmunes como neutrófilos y macrófagos. Los fibroblastos, por otro lado, se consideran importantes jugadores que determinan el destino de las heridas orales, ya que son capaces de proliferar a una tasa más alta que sus contrapartes dérmicas [25].

En resumen, la curación y la regeneración periodontal necesitan diferentes procesos secuenciales. Primero, hay una fase coagulante/vascular; en segundo lugar, se establece una fase inflamatoria y de granulación. Después, la angiogénesis y

mineralización ósea, propia de la fase de regeneración periodontal. Finalmente, se establece la fase de estabilidad denominada remodelación periodontal [26].

Enfermedad periodontal

La enfermedad periodontal es la principal causa de pérdida de dientes, y está muy asociada con factores de riesgo tales como la diabetes mellitus, la obesidad, el síndrome metabólico y la osteoporosis, entre otros [27]. La interacción entre los microorganismos patógenos y el sistema inmune del huésped desencadena, en determinadas circunstancias, una respuesta inflamatoria que causa que las encías se inflamen y sangren fácilmente. Esta etapa temprana se la conoce como gingivitis, la forma más leve de enfermedad periodontal. Cuando no se trata, la biopelícula dental se extiende y continúa invadiendo la zona gingival, causando una mayor irritación de las encías que conduce a la etapa crónica conocida como periodontitis (**Figura 3**). A nivel celular, la placa dental genera una respuesta inflamatoria local que implica la secreción de factores proinflamatorios, como citoquinas y especies reactivas de oxígeno, así como la desregulación de metaloproteinasas de matriz (MMP) [28]. Entre ellas, las MMP son algunos de los factores del huésped más importantes responsables de la degradación del colágeno y de la matriz extracelular involucrada en la enfermedad periodontal [29]. A medida que avanza, las citoquinas, promueven la resorción ósea por los osteoclastos [30]. Poco a poco, el daño en los tejidos de soporte conduce a la recesión gingival y a la formación de la bolsa periodontal. Posteriormente, la absorción y destrucción del hueso alveolar, del ligamento periodontal y del cemento, constituyen la causa principal de la pérdida de dientes en adultos [31]. Los eventos celulares y moleculares de la inflamación y los mecanismos de respuesta inmune responden inicialmente "de manera normal" a la biopelícula subgingival. Sin embargo, los productos del biofilm subgingival y los factores de riesgo del paciente desencadenan el desarrollo de la enfermedad periodontal.

El tratamiento de la enfermedad periodontal difiere según la etapa de la enfermedad. Antibióticos sistémicos, dispositivos de administración local de antimicrobianos y el curetaje de piezas dentarias representan ejemplos de diferentes estrategias clínicas [32–34]. En el caso particular de la periodontitis crónica, un enfoque consiste en la regeneración tisular guiada.

A pesar de todos los tratamientos disponibles, la regeneración periodontal es todavía un desafío en la odontología. El diagnóstico precoz de la gingivitis con la implementación de una salud oral adecuada todavía constituye el mejor pronóstico para pacientes con riesgo de desarrollar la enfermedad periodontal. Sin embargo, el conocimiento actual de las causas subyacentes de esta enfermedad proporciona la base para el diseño racional de nuevos materiales destinados a detener su progresión y ayudar en la regeneración del tejido afectado.



Figura 3. Etapas de la enfermedad periodontal

Biomateriales en la salud oral

Colágeno

El colágeno es la proteína más abundante de la matriz extracelular (ECM) presente de manera natural en los tejidos humanos (por ejemplo, piel, hueso, cartílago, tendón y ligamentos). Representa el 25% del contenido total de proteína en el cuerpo, que proporciona fuerza e integridad al tejido. Además, el colágeno también puede interactuar con las células y ayuda a la señalización celular que regulará el anclaje celular, la migración, la proliferación, la diferenciación y la supervivencia [35–38].

Hasta el momento han sido identificados veintisiete tipos de colágenos, siendo los tipos I-IV los más comunes. El colágeno tipo I es la proteína más abundante presente en los mamíferos y la más estudiada para aplicaciones biomédicas. El colágeno es enzimáticamente degradado dentro del cuerpo, principalmente a través de colagenasas, gelatinasas y metaloproteinasas. En términos generales, los colágenos son proteínas de triple hélice que presentan una alta resistencia mecánica y una buena biocompatibilidad. Puede formar fibras estables y sus propiedades

mecánicas, de degradación y de absorción de agua pueden ser mejoradas aún más por la reticulación química (es decir, usando glutaraldehído, genipina, carbodiimida u otros) [39–41], por reticulación física o mediante la formación de híbridos y materiales compósitos (**Figura 4**) [42].

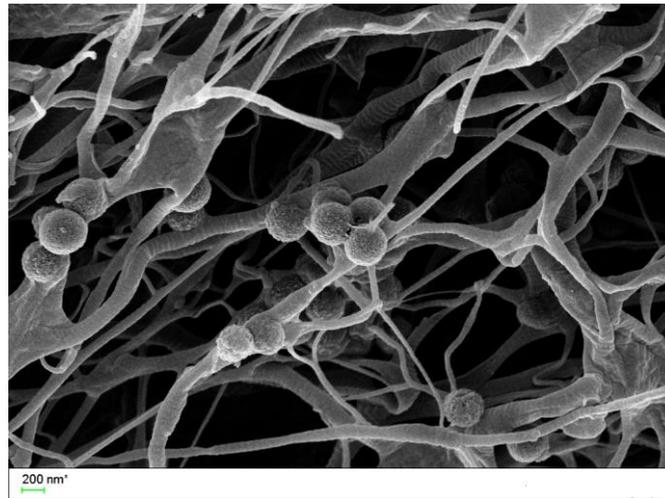


Figura 4. Imagen SEM representativa de un compuesto de sílica-colágeno.

La baja respuesta inflamatoria y citotóxica y la biodegradabilidad son otras propiedades atractivas del colágeno. Como resultado, y porque el colágeno es uno de los componentes principales de la ECM humana, por lo general es considerado como un biomaterial ideal para la ingeniería de tejidos y para aplicaciones de apósitos para heridas [43,44] (**Figura 5**).

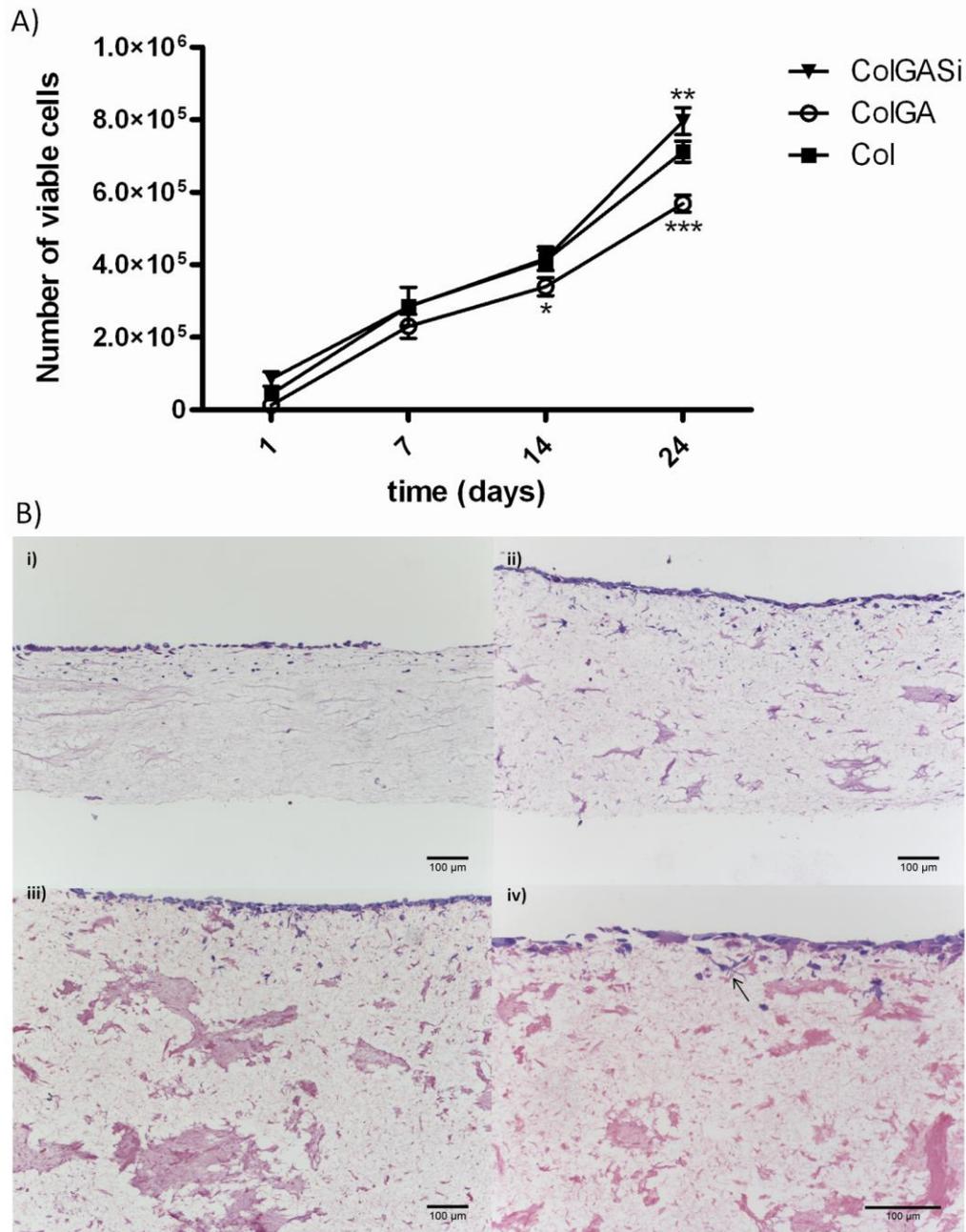


Figura 5. Proliferación, viabilidad y penetración de células fibroblásticas de L929 en andamios de colágeno puro, con glutaraldehído y recubiertos de sílica. (A) reducción MTT de las células sembradas cuando se cultivan hasta 24 días en medio completo sobre los andamios seleccionados ($n=3$, las barras de error muestran SD). * indica diferencias estadísticamente significativas entre el colágeno recubierto de sílice (ColGASi) y matrices reticuladas con glutaraldehído (ColGA), $p<0,05$. (B) La tinción con hematoxilina-eosina de secciones transversales verticales muestra la penetración fibroblastos en los materiales en estudio después de 24 días. Las imágenes se muestran para (i) colágeno puro, (ii) 0.2 ColGA, y (iii y iv) 0.2 ColGASi. La flecha indica la migración de fibroblastos. “Reimpreso de ref. [45]. Derechos de autor (2013) con el permiso por la Royal Society of Chemistry”

El colágeno es aislado usualmente de tejidos animales. Sin embargo, la técnica de purificación enzimática (para eliminar los telopéptidos inmunogénicos que pueden inducir una respuesta indeseada) también puede ser empleada [46]. Las matrices de colágeno producidas de forma natural y sintética, así como andamios tridimensionales de colágeno más sofisticados pueden proporcionar ambientes claves en las escalas nano, micro y meso para moléculas, células, proteínas y fluidos [47].

El colágeno puede imitar el tejido blando periodontal. Por esta razón, puede mejorar el sellado biológico y osteointegración en implantes dentales y promover la reconstrucción del tejido en la periodontitis severa, caracterizada por la recesión gingival y la formación de bolsas periodontales.

Quitosano

El quitosano es un polisacárido catiónico natural, lineal, constituido por D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina, que se obtiene por desacetilación alcalina de la quitina. El término quitosano también se lo emplea para describir una serie de derivados de la quitina que tienen diferentes grados de desacetilación. Las propiedades químicas, físicas y biológicas del quitosano están directamente relacionadas con su grado de desacetilación y su peso molecular [48,49]. Además, el quitosano es considerado como un polímero biodegradable, biocompatible, no antigénico, no tóxico, bioadhesivo, antimicrobiano, bioactivo y con efectos hemostáticos [50–52]. De hecho, la lisozima, una enzima de la saliva puede degradar el quitosano. Esta biodegradación que está influenciada por el grado de acetilación podría ser relevante para el diseño de dispositivos de administración oral biodegradables [48] ya que los dispositivos biodegradables han demostrado una mejor aceptación por el paciente. Además, los grupos amino e hidroxilo del quitosano pueden modificarse químicamente, permitiendo así una alta versatilidad química [46,53].

El quitosano se puede procesar fácilmente en hidrogeles [54] (**Figura 6**), membranas [55], nanofibras [56], micro/nanopartículas [57], andamios [58] y esponjas [59] para varias aplicaciones de tipo biomédico tales como la administración de fármacos, la cicatrización de heridas y la ingeniería de tejidos [60,61].

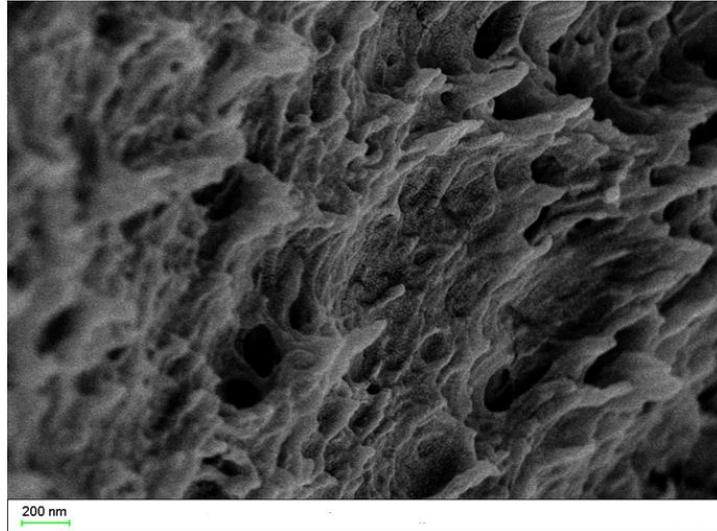


Figura 6. Imagen obtenida por SEM representativa de un gel de quitosano.

El quitosano proporciona una matriz no proteica tridimensional para la regeneración de tejido y activa los macrófagos para la actividad tumoricida. También estimula la proliferación celular y la organización del tejido histoarquitectónico. En este sentido, *Muzzarelli et al.* informaron que el quitosano y el ácido ascórbico se pueden usar en forma de gel para su aplicación en la cavidad oral presentando una serie de ventajas biológicas útiles para la estimulación de una regeneración ordenada de tejidos heridos. De hecho, pocos días después del tratamiento con quitosano, aún era posible notar la presencia de esta macromolécula mostrando una organización de panal tridimensional. Esta apariencia era una condición funcional requerida para la estimulación de la regeneración del tejido [62] **(Figura 7)**.

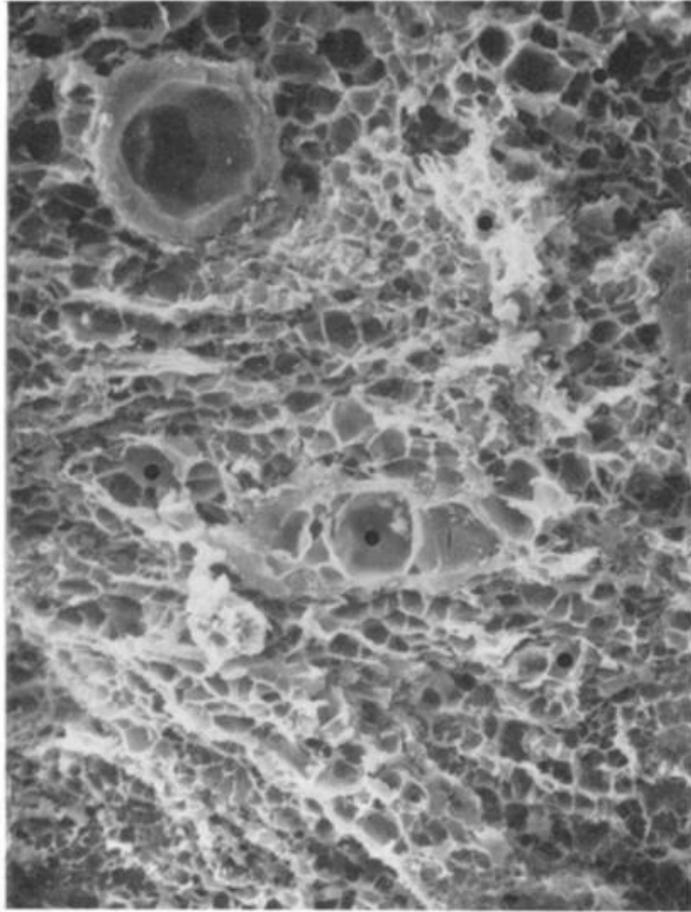


Figura 7. Organización de panal de abejas del quitosano *in vivo* revelado por SEM. X687 obtenida después del decimoquinto día del tratamiento con quitosano. " Reimpreso de ref. [62]. Derechos de autor (1989), con el permiso de Elsevier ".

Además, el quitosano ayuda en la coagulación de la sangre y bloquea las terminaciones nerviosas reduciendo el dolor. El quitosano se despolimeriza gradualmente para liberar N-acetil-b-D-glucosamina, que inicia la proliferación de fibroblastos, ayuda a promover la deposición de colágeno ordenado y estimula el aumento de niveles de síntesis de ácido hialurónico natural en el sitio de la herida. Eso ayuda a acelerar la curación de heridas y la prevención de cicatrices. También es fácilmente degradado por hidrólisis química, así como por ciertas enzimas humanas [46]. Los biomateriales basados en quitosano por ser naturales y biodegradables presentan buenas características para la regeneración guiada de tejido y la administración local de fármacos.

Sílica

La sílica, un ejemplo de material cerámico, es ampliamente utilizada en odontología. Los materiales cerámicos bioactivos promueven la formación de hueso, un punto clave en enfermedades como la periodontitis, en la que la inflamación y la respuesta inmune causa la destrucción del tejido periodontal. Además, los compósitos de sílica generalmente se emplean como rellenos dentales [63]. Sin embargo, todos estos cerámicos son frágiles, y por esta razón su principal aplicación durante años ha sido como material de injerto para el llenado de pequeños defectos óseos y anomalías periodontales [64,65].

Los cerámicos basados en silicatos, como una nueva familia de biomateriales, han demostrado ser excelentes materiales para la regeneración del tejido óseo, y su preparación, resistencia mecánica, mineralización de apatita y propiedades biológicas han sido ampliamente estudiadas [66–71].

A principios de la década de 1970, Hench y sus colegas desarrollaron una nueva clase de biomateriales, basado en $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ [72]. Una de las características significativas de los materiales bioactivos basados en Ca-Si es que pueden inducir la formación en fluidos corporales simulados de una capa de hidroxiapatita o hidroxiapatita carbonatada en su superficie similar a la fase mineral del hueso. Esta clase de material bioactivo basado en Ca-Si puede osteointegrarse con el hueso del individuo. En estudios adicionales, también se ha demostrado que los productos iónicos Ca^{2+} y Si^{4+} liberados de los vidrios bioactivos 45S5[®] contribuyen a su bioactividad, ya que el Ca y el Si pueden estimular la proliferación de osteoblastos y producir su diferenciación *in vitro* [73]. Los resultados indicaron que los productos iónicos del Ca y el Si del vidrio bioactivo pueden aumentar la disponibilidad de IGF-II en osteoblastos al inducir la transcripción del factor de crecimiento y su proteína transportadora y también regular la disociación de este factor de la proteína de unión. El IGF-II no unido es probable que sea responsable del aumento de la proliferación celular observado en experimentos de cultivo celular. Una inducción de la transcripción de los componentes de la matriz extracelular, su secreción y autoorganización en una matriz mineralizada podría ser responsable de la formación rápida y crecimiento de nódulos óseos y diferenciación del osteocito maduro en presencia de vidrio bioactivo [74]. Por otra parte, el SiO_2 es un promotor documentado de diferenciación y su incorporación ha demostrado

una mejora en la adhesión, proliferación, diferenciación y mineralización de osteoblastos MG63 (**Figura 8**) [75,76].

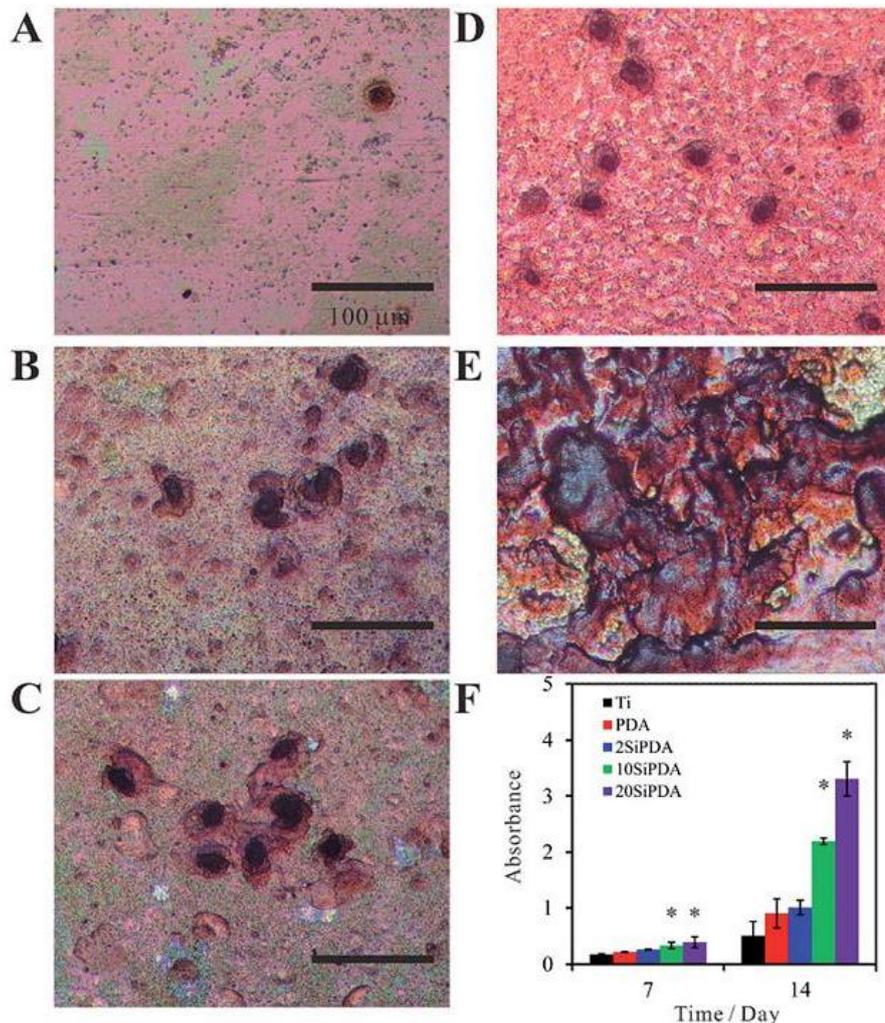


Figura 8. Tinción con rojo de alizarina S de células MG63 cultivadas en (A) Ti, (B) PDA, (polidopamina) (C) 2SiPDA, (D) 10SiPDA y (E) 20SiPDA durante 14 días. (F) Cuantificación de depósitos minerales de calcio mediante ensayo Alizarin Red S de células MG63 cultivadas en varios ejemplares durante 7 y 14 días. * Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) del control Ti. Reimpreso de ref. [75] Derechos de autor (2015), con el permiso de la Royal Society of Chemistry.

Hasta la fecha, los andamios cerámicos han presentado importantes ventajas en comparación con los andamios poliméricos, ya que son estructuras con adecuada porosidad y con texturas químicas que promueven la diferenciación de células madre mesenquimales y mineralización de la matriz extracelular, y además carecen de subproductos tóxicos como los encontrados en materiales poliméricos [77]. La posibilidad de sintetizar materiales biocerámicos con una variedad de métodos,

como sol-gel, da la oportunidad de desarrollar materiales con una porosidad, estructura, y morfología controlada y en muchos casos biocompatibles [78–82].

Por otra parte, el recubrimiento de andamios cerámicos con polímeros biodegradables ha demostrado impartir propiedades funcionales a las superficies de los andamios y mejorar sus propiedades mecánicas. Algunos ejemplos incluyen a la gelatina [77], donde los resultados obtenidos por *Gouduri et al.* mostraron que los poros de los andamios estaban completamente interconectados y las microfotografías SEM mostraban un tamaño de poro de aproximadamente 200-400 mm y un espesor de aproximadamente 150-200 mm implicando que un andamio debe tener una estructura porosa interconectada con tamaños de poro entre 300 y 500 mm para la penetración celular, la vascularización, y el transporte de nutrientes y desechos metabólicos [77].

La sílica no solo puede usarse como andamio, sino también en forma de nanopartículas para crear rellenos [83,84]. Las propiedades de las nanopartículas difieren claramente según su volumen [85,86]. La solubilidad y la reactividad de las nanopartículas aumenta significativamente por la alta energía superficial y la gran área de superficie que poseen [87]. Esta gran área de superficie proporciona una alta afinidad y les permite depositarse fácilmente en espacios irregulares. Inspirado por las propiedades del fosfato de calcio (CPP), la sílica y los nanomateriales, *Tian et al.* usaron nanopartículas de sílica mesoporosas con la adición de Ca^{2+} y PO_4^{3-} para oclusión del túbulo dentinal [88]. Sus resultados demostraron una buena remineralización.

Las partículas de diatomita, básicamente nanopartículas de sílica porosas, también se han utilizado para mejorar las propiedades mecánicas de rellenos dentales. En 2011, *Wang et al.* estudiaron los beneficios de partículas de sílica mesoporosas y no porosas combinadas como rellenos. Sus resultados muestran que la ventaja de usar partículas de co-llenado en compósitos de tipo híbrido es que las nanopartículas pueden "llenar" las regiones entre las micropartículas. Por lo tanto, la densidad del esqueleto inorgánico se incrementa, llevando a una fracción de masa más grande de relleno y una reducida contracción polimérica. Como señalan los autores, los rellenos de diatomita porosa pueden considerarse para mejorar las propiedades mecánicas y el contenido de relleno de compósitos dentales. Por otro lado, los autores notaron que las partículas de diatomita tienen una gran cantidad

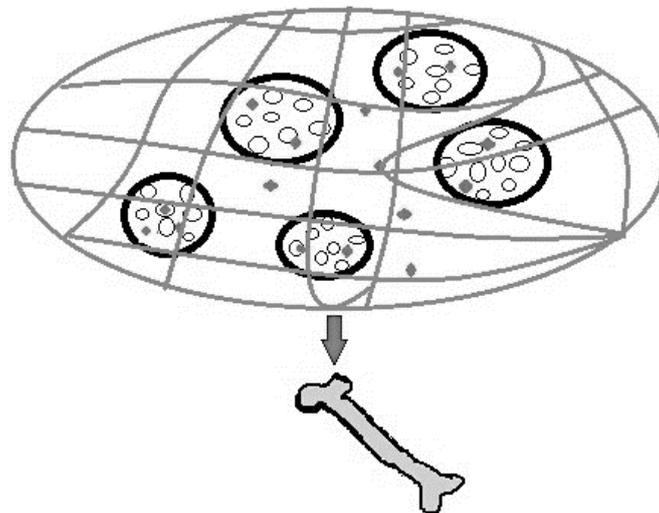
de impurezas, que pueden bloquear los poros y afectar la estética y las propiedades mecánicas. Por lo tanto, estas muestras deben purificarse antes de su uso [89]. Otra cosa a tener en cuenta en los implantes es su posible colonización bacteriana que puede conducir al aflojamiento del implante y, en casos severos, a su pérdida. Para superar este inconveniente, *Massa et al.* prepararon un recubrimiento antibacteriano en la superficie del implante de titanio usando nanopartículas de plata en un recubrimiento de sílica utilizando una técnica sol-gel. El recubrimiento produjo un fuerte efecto antibacteriano sobre la superficie de titanio matando a las bacterias adherentes e inhibiendo la formación de biopelícula. La actividad antibacteriana a largo plazo fue probada contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y los resultados indicaron que este tipo de modificación de la superficie a nanoescala es una estrategia prometedora para controlar las infecciones asociadas con implantes dentales [90].

Objetivos específicos

- Desarrollo de un compósito constituido por colágeno-nanopartículas de sílica y evaluar su performance como un sistema de liberación local de ibandronato, el efecto diferenciador sobre células mesenquimales de las nanopartículas de sílica y efecto en la incorporación del fármaco en distintos tipos de nanopartículas de sílica.
- Desarrollo de un hidrogel de quitosano cargado con timol, un compuesto con propiedades antimicrobianas y antioxidantes proveniente de aceites esenciales de las plantas *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare*. Evaluación de su liberación, la adhesión y la agregación de bacterias sobre los hidrogeles, actividad antimicrobiana frente *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus* y actividad antioxidante.
- Desarrollo de un compósito constituido por quitosano, carboximetilcelulosa y nanopartículas de sílica y evaluar su performance como un sistema de liberación de un extracto acuoso de *Larrea divaricata* Cav., su actividad antioxidante, la incorporación de los distintos activos del extracto y la bioactividad *in vitro* de los compósitos.
- Desarrollo de un hidrogel de quitosano modificado con DDSA (anhídrido dodecenilsuccínico). Evaluación del impacto en la liberación de un activo como el timol que es poco soluble en agua en los hidrogeles modificados químicamente con cadenas hidrocarbonadas. Evaluación preliminar *in vivo* en un modelo de enfermedad periodontal animal de los hidrogeles modificados y no modificados.

CAPÍTULO 2:

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA CARGADAS CON IBANDRONATO Y SUS COMPÓSITOS CON COLÁGENO



1.Introducción

Inicialmente, los bisfosfonatos (BP) mostraron tener una alta afinidad por la hidroxiapatita ósea y la capacidad de inhibir la disolución de cristales de fosfato de calcio *in vitro* [91]. Más tarde, se observó que más allá de este efecto fisicoquímico también inhiben la resorción ósea *in vivo*. El efecto farmacológico de los bisfosfonatos está relacionado con su unión al hueso y su efecto bioquímico sobre las células, predominantemente osteoclastos [92]. Los bisfosfonatos tienen dos mecanismos principales de inhibición sobre los osteoclastos que dependen de las características del fármaco. En el caso de la primera generación de bisfosfonatos, que no contienen átomos de nitrógeno en su estructura, actúan como análogos de los pirofosfatos y se metabolizan a un análogo citotóxico de ATP [93]. Los bisfosfonatos de segunda generación, como el ibandronato de sodio, inhiben la farnesil pirofosfato sintasa reduciendo la cantidad de farnesil difosfato (FPP) y de geranil geranil difosfato (GGPP) requerido para la prenilación de proteínas [94] (Figura 9).

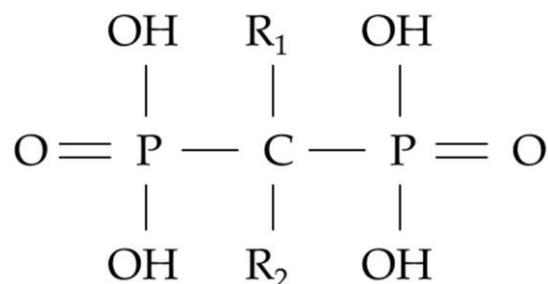


Figura 9. Estructura química de un BP. Si está presente un grupo nitrógeno o amino, el BP "contiene nitrógeno".

Cuando se inhibe la prenilación, la actividad de los osteoclastos disminuye conduciendo a la apoptosis [95]. Estos fármacos se recomiendan para la enfermedad de Paget, la hipercalcemia y la osteoporosis. La vía oral es la preferida para la terapia crónica con estos fármacos. Sin embargo, la mayor desventaja es su pobre absorción (menos del 1% de la dosis oral) en el tracto gastrointestinal. La administración i.v. de BP es una ruta alternativa, donde aproximadamente 30-80% de la dosis se excreta en la orina, y la mayoría restante permanece ligada al hueso por largos períodos de tiempo [96].

Además de la administración sistémica de estos fármacos, la aplicación local de BP ha ganado atención en los últimos años debido a ventajas tales como la reducción de efectos adversos y una alta concentración local. Este hecho condujo al desarrollo de diferentes sistemas de liberación locales como recubrimientos [97], nanopartículas [98,99], hidrogeles o nanocompuestos [100,101]. Por ejemplo, en un estudio fueron preparadas microesferas de quitosano y poli (ácido-L-láctico-co-glicólico) (PGLA) cargados con alendronato para su uso en ortopedia y en el área dental. Se observó que el 85% del fármaco fue liberado de las microesferas de quitosano al final del tercer día, mientras que el 58% fue liberado al final del quinto día a partir de microesferas de PGLA [102]. Adicionalmente, se han realizado algunos experimentos *in vivo* con hidrogeles de ácido hialurónico en donde el zoledronato es administrado localmente. En ellos aumentó la tasa de formación de hueso hasta un 100% durante los primeros 17 días después de la implantación y se redujo la tasa de resorción del hueso en un modelo femoral de rata ovariectomizada [103]. Además, el zoledronato también se injertó en implantes de titanio con recubrimientos de hidroxiapatita. Estos implantes se insertaron en cóndilos de rata y mostraron un efecto positivo en la densidad ósea alrededor del implante y una mayor fijación mecánica [104].

Además de su función antirresortiva, los BP también pueden ser localmente utilizados con otros fines. En este sentido, un hidrogel de poli (2-hidroximetilacrilato) se funcionalizó con alendronato para el tratamiento de heridas crónicas. La patología común en estas heridas crónicas es la excesiva actividad proteolítica, lo que resulta en la degradación de factores críticos de la capacidad de la úlcera para sanar. Como las metaloproteinasas de matriz son endopeptidasas dependientes de zinc que muestran un aumento en la actividad en el fluido de la herida crónica, los autores probaron que su actividad podría inhibirse con el bifosfonato alendronato que es capaz de unirse al metal divalente Zn^{2+} [105].

Para la selección de los constituyentes más apropiados para hidrogeles, un posible enfoque desafiante es el "biomimético", en donde el biomaterial preparado debe parecerse lo más cerca posible al tejido que se va a reparar [106–111]. En este sentido, hay esfuerzos recientes para construir materiales similares al hueso con colágeno [42]. Se han desarrollado matrices con silicio que muestran un incremento en las propiedades reológicas, una digestión enzimática más lenta y cuando se

siembran células en estas matrices éstas pueden adherirse, proliferar y migrar dentro del andamio [43,45,112,113]. Además, las nanopartículas de sílica han ganado terreno en el campo biomédico por su biocompatibilidad, biodegradabilidad, por ser inertes y estables, lo que permite una variedad de diseños de formulación para la aplicación en la industria farmacéutica [87,114–116].

El objetivo del presente capítulo fue desarrollar nanopartículas de sílica sólidas, de sílica sólidas modificadas con grupos amino y nanopartículas de sílica mesoporosas como portadoras de ibandronato de sodio. Posteriormente, estas nanopartículas se incorporaron en hidrogeles de colágeno para desarrollar un nuevo sistema de liberación local. La liberación de ibandronato desde las nanopartículas o desde los compósitos de NP-colágeno también se describió y comparó. Adicionalmente, la toxicidad celular de NPs en células SAOS-2 se realizó utilizando un ensayo de MTT y el efecto sobre la diferenciación de células mesenquimales fue evaluado midiendo la actividad de la fosfatasa alcalina.

2. Materiales y métodos

2.1. Síntesis de nanopartículas

Se sintetizaron tres tipos diferentes de nanopartículas de sílica. Las nanopartículas de sílica sólidas fueron obtenidas por el método de Stöber [117]. En pocas palabras, el tetraetil ortosilicato (TEOS) fue añadido a una solución en agitación de hidróxido de amonio (30%) en una mezcla de agua/etanol para obtener nanopartículas de sílica. Las soluciones se agitaron durante 24 horas a temperatura ambiente y las nanopartículas resultantes se recuperaron por centrifugación y se lavaron con agua hasta que se alcanzó un pH neutro. La concentración de sílica de las nanopartículas se determinó ponderando la masa residual de una alícuota secada a 80 °C.

Las nanopartículas de sílica modificadas con grupos amino se obtuvieron usando el método de Stöber descrito anteriormente y el aminopropiltriétoxosilano (APTES) y TEOS se agregaron a la solución de hidróxido de amonio en una proporción de 1:4 (Figura 10).

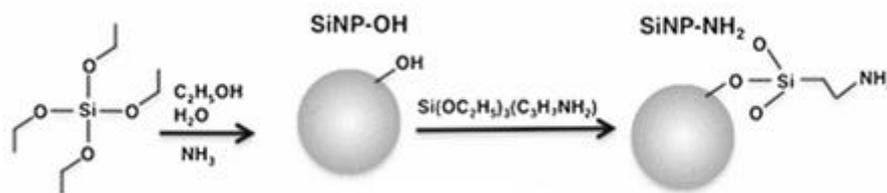


Figura 10. Síntesis de nanopartículas de sílica sólidas modificadas con grupos amino

Las nanopartículas mesoporosas se sintetizaron añadiendo 5,0 g de etanol (108,70 mmol), 1,4 g de amoníaco (20,59 mmol) y 0,21 g de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (0,58 mmol) en 3,85 ml de agua (213,89 mmol) en agitación. Después de 15 minutos, se agregó 0,39 g de TEOS (1,88 mmol) gota a gota en la solución anterior. La solución fue colocada en agitación por 4 hs. El CTAB fue eliminado por digestión en microondas (MLS 1200 Mega, Milestone, Bergamo, Italia) en una mezcla de HNO_3 : H_2O_2 (9:1 v/v). Las NPs sintetizadas se centrifugaron, se lavaron con etanol y agua, y luego se secaron al vacío [118].

2.2. Caracterización de nanopartículas: área superficial, morfología y distribución de tamaño

El área superficial específica, el volumen total de poro y el tamaño de poro se midieron para las nanopartículas de sílica mediante isothermas de absorción de nitrógeno a 77 K utilizando un analizador de adsorción de gas automático (Gemini 2360 V 2.00). Antes de la medición, el polvo de nanopartículas se desgasificó durante 24 hs a 150°C. La superficie específica se calculó de acuerdo con la teoría de Brenauer- Emmett-Teller (BET) [119], mientras que la distribución del tamaño de poro y el volumen total de poro se calcularon por el Método Barrett-Joyner-Halenda (BJH) [120].

La forma y el aspecto se evaluaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las nanopartículas se analizaron por SEM usando un Microscopio Zeiss Supra 40 y las muestras para el análisis fueron metalizadas con oro en una atmósfera de argón. El análisis por TEM se realizó utilizando un MET Zeiss 109.

El análisis del tamaño de partícula y la potencial zeta se realizó mediante el método de dispersión dinámica de luz (DLS). Las muestras fueron suspendidas en KCl 10

mM, se sonicaron durante 30 segundos y posteriormente fueron analizadas. Se realizó el análisis por triplicado a cada muestra de nanopartículas.

2.3. Isotermas de adsorción para NPs de sílica con ibandronato de sodio

Los experimentos de adsorción de ibandronato se llevaron a cabo por un método en batch a temperatura ambiente (25°C). Los tres tipos de nanopartículas de sílica obtenidas (20 mg) se pusieron en contacto con 1 mL de soluciones de ibandronato de sodio que van desde 7,5 a 0,1 g.L⁻¹. Las isotermas de adsorción se determinaron mediante la cuantificación del fármaco en la solución sobrenadante. El método empleado para evaluar la concentración de ibandronato de sodio en las soluciones fue el de electroforesis capilar (CE).

2.4. Método de electroforesis capilar

La cuantificación del ibandronato se llevó a cabo en un sistema de electroforesis capilar Agilent con detector de arreglo de diodos (Agilent Tecnologías). Se realizó el análisis de electroforesis capilar utilizando una columna capilar de sílice fundida sin recubrimiento (Polimicro Technologies, Phoenix, Arizona, EE. UU.) de 50 µm de diámetro interno y 50 cm de longitud total (40 cm al detector). El electrolito soporte (BGE) consistió en una solución de ácido ftálico 7,5 mM de pH 3,5. La solución BGE fue filtrada a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm y sonicada (Transsonic 540, 35 kHz; Elma, Singen, Alemania) antes de ser utilizada. El voltaje aplicado fue -30 kV. Para la introducción de la muestra, se aplicó una presión positiva (500 mbar.s⁻¹). La detección UV indirecta en línea se llevó a cabo a 205 nm [121]. Para el acondicionamiento se lavaron los capilares con agua destilada durante 5 minutos, hidróxido de sodio 0,5 M por 10 min, agua destilada por 5 min y finalmente BGE por 10 min. Entre cada inyección, el capilar fue lavado con BGE durante 2 min.

Se preparó una solución de 1000 µg.mL⁻¹ de ibandronato sódico en agua para construir una curva estándar en el rango de 1 a 100 µg.mL⁻¹. Las muestras se obtuvieron del sobrenadante de MNP o de los compósitos con colágeno incubados en agua destilada (como se indica en la sección de experimentos de adsorción y liberación) e inyectado después de la centrifugación. Todos los experimentos y medidas fueron realizados por triplicado.

2.5. Determinación de los perfiles de liberación en nanopartículas con ibandronato *in vitro*

La liberación de ibandronato desde las nanopartículas fue evaluada en agua a 37°C. En resumen, a las nanopartículas conteniendo 60 mg de fármaco se añadieron 5 mL de agua y la suspensión fue sonicada durante 20 segundos para dispersarlas. La suspensión de nanopartículas se colocó en un shaker a una velocidad de 100 rpm.min⁻¹. El medio líquido fue completamente reemplazado con agua destilada en varios intervalos luego de una centrifugación para separar las nanopartículas. La cantidad de ibandronato liberado al sobrenadante se midió por electroforesis capilar de acuerdo con el método descrito anteriormente.

2.6. Síntesis y caracterización de los compósitos de sílica-colágeno

El colágeno tipo I se purificó a partir de colas de rata y la concentración se estimó mediante una titulación de hidroxiprolina [122]. Los compósitos se prepararon mezclando una suspensión de colágeno de una concentración de 5,0 mg.mL⁻¹ en una solución de ácido acético 17 mM con una suspensión que contiene 0,25 M de nanopartículas de sílica cargadas con fármaco (15 mg por gel). Los soles resultantes se colocaron en placas de 24 pocillos y se dejó durante 2 hs bajo los vapores de amoníaco. Finalmente, los hidrogeles se dejaron bajo una campana de extracción para evaporar el amoníaco hasta alcanzar pH 7. Posteriormente, se realizó un análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM) de los compósitos. Por este motivo, éstos se fijaron usando 3,63% de glutaraldehído en un buffer cacodilato/sacarosa (0,05 M/0,3 M, pH 7,4) durante 1 hora a 4°C. Después de la fijación, las muestras se lavaron tres veces con el mismo buffer y fueron deshidratadas a través de lavados con soluciones de concentraciones crecientes de etanol de 70% a 100%. A partir de entonces, las muestras se secaron en un secador de punto crítico y fueron metalizadas con oro (10 nm) para el análisis [123]. Se observaron las muestras con un microscopio Zeiss Supra 40 para microscopía electrónica de barrido (SEM).

También se realizaron ensayos de liberación de ibandronato desde los compósitos. Para este propósito, cada hidrogel se dejó con 1,25 mL de agua en un agitador rotatorio a una velocidad de 100 rpm.min⁻¹. El medio líquido fue completamente reemplazado por agua destilada en varios intervalos de tiempo.

2.7. Cultivo de células y experimentos de toxicidad *in vitro*

La línea celular SAOS-2 (sarcoma osteogénico) creció en botellas de cultivo adherentes en medio DMEM (Sigma) complementado con un 10% de suero de ternera fetal inactivado por calor y un 1% de penicilina-estreptomina. Las células se mantuvieron a 37°C en un ambiente humidificado con dióxido de carbono al 5% hasta que se alcanzó la confluencia. La recolección se realizó con una solución de tripsina-EDTA siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Antes de su uso, las células se tiñeron con azul tripán y se contaron en una cámara de Neubauer.

Para los experimentos de toxicidad, las células fueron sembradas (1×10^4 por pocillo) y se agregaron suspensiones de nanopartículas de sílica en concentraciones que van de 0,06 a 2,4 mg.mL⁻¹ seguido por adición de 1 mL de DMEM. Después de un período de cultivo de 2 días, la actividad metabólica celular se midió usando un ensayo MTT. Para ese propósito, el medio fue removido, reemplazado por 0,45 mL de medio fresco y 0,05 mL de una solución de MTT en una concentración de 5 mg.mL⁻¹ e incubado en una cámara de dióxido de carbono al 5% humidificado durante 4 hs. Después de la incubación, la solución de MTT fue eliminada y se añadió 1 mL de etanol absoluto para solubilizar el precipitado. La absorbancia se registró a 570 nm [123]. En todos los casos, los resultados fueron expresados como media \pm SD a partir de experimentos realizados por triplicado.

2.8. Diferenciación de células mesenquimales

Dado que los osteoblastos muestran una actividad de fosfatasa alcalina alta (AP), la actividad de esta enzima es un marcador factible para evaluar la diferenciación celular. Para ello, se obtuvieron células mesenquimales de médula ósea femoral de ratas según el protocolo aislamiento de MSCs de rata [37] y se cultivaron en medio de cultivo α -MEM. Posteriormente, las células se tripsinizaron y se plaquearon en placas de cultivo de 24 pocillos (4 réplicas para la detección de la actividad fosfatasa alcalina) a una concentración de 1.000 células por pocillo en 1 mL de medio. Después de alcanzar la confluencia, los diferentes medios de cultivo fueron agregados y renovados cada dos días. Para un control positivo los medios de cultivo α -MEM se complementaron con 20 mM de β -glicerofosfato, 100 nM de dexametasona y 50 μ M de ácido ascórbico.

Se añadieron las nanopartículas mesoporosas a los medios de cultivo en concentraciones de $0,36 \mu\text{g.L}^{-1}$ y $3,6 \mu\text{g.L}^{-1}$. Simultáneamente se agregaron también nanopartículas cargadas con ibandronato de sodio de 10^{-8} M y 10^{-7} M. Por otro lado, se preparó medio de cultivo α -MEM con ibandronato sódico 10^{-8} M pero sin nanopartículas. Las células se lavaron y lisaron después de 5, 10 y 15 días con 400 μL de un buffer de lisis que contiene 0,1 M de dietilamina (DEA), 1 mM de MgCl_2 y 0,1% de Triton-100X.

La actividad de la fosfatasa alcalina se determinó con p-nitrofenilfosfato como el sustrato. Básicamente, 50 μL de muestra fue añadido a 100 μL de p-nitrofenilfosfato (5 mM) en el mismo buffer utilizado para la lisis e incubado a 37°C durante 60 min en agitación. La reacción enzimática se detuvo añadiendo 20 μL de NaOH 1 M. La actividad de la enzima se cuantificó por mediciones de absorbancia a 405 nm y calculadas según una curva de calibración.

2.9. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por lo menos en triplicado y fueron estadísticamente analizados por ANOVA de una vía. Las diferencias se analizaron usando ANOVA de una vía, seguido de la comparación múltiple de la Prueba de Bonferroni, cuando la diferencia fue $p < 0,05$ se consideró significativa.

3. Resultados y discusión

3.1. Caracterización de partículas

Se obtuvieron tres tipos de partículas de sílica. Las partículas de sílica sólidas (SNP) tenían un diámetro medio de $656,5 \pm 94,1 \text{ nm}$. El análisis del tamaño de partícula usando DLS también reveló una homogeneidad en la distribución confirmada por imágenes TEM, así como la ausencia de agregación significativa (**Figura 11A**). Cuando estas nanopartículas se modificaron mediante la adición de APTES, el potencial zeta ζ cambió de -42 mV a $+19 \text{ mV}$ mostrando el éxito de la incorporación de grupos amino a la superficie de las nanopartículas. El tamaño de partícula medido por DLS fue $630,0 \pm 48,9 \text{ nm}$, similar al obtenido para las SNPs originales. El tamaño de partícula observado para las nanopartículas mesoporosas (MNP) fue de un diámetro medio de $532,9 \pm 35 \text{ nm}$ como se puede ver en las imágenes TEM y SEM (**Figura 11B y C**). Las mediciones BET revelaron para las MNP una superficie

específica de $596,9 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ y un volumen total de poro de $0,331 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ con un radio poroso de $1,25 \text{ nm}$. En el caso de partículas sólidas, el área de superficie específica estaba alrededor de $17,4 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ lo que confirma la ausencia de porosidad.

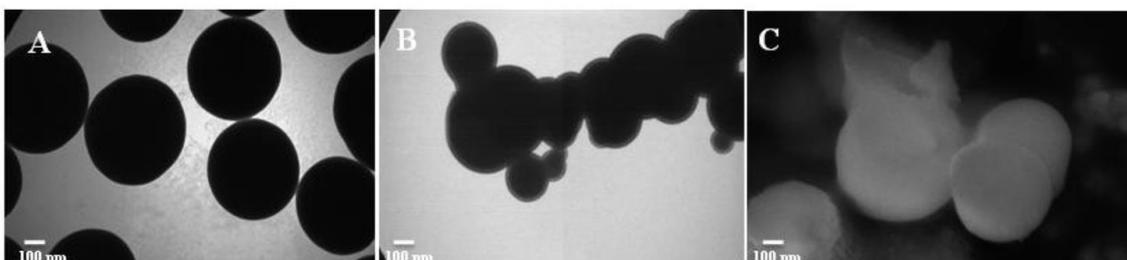


Figura 11. Imágenes TEM y SEM de nanopartículas de sílica. A) TEM para nanopartículas SNP b) TEM para MNP c) SEM para MNP.

3.2. Incorporación de ibandronato de sodio en nanopartículas y liberación del fármaco *in vitro*

Las isothermas de adsorción se realizaron para las nanopartículas con grupos amino y las nanopartículas mesoporosas por electroforesis capilar (Figura 12).

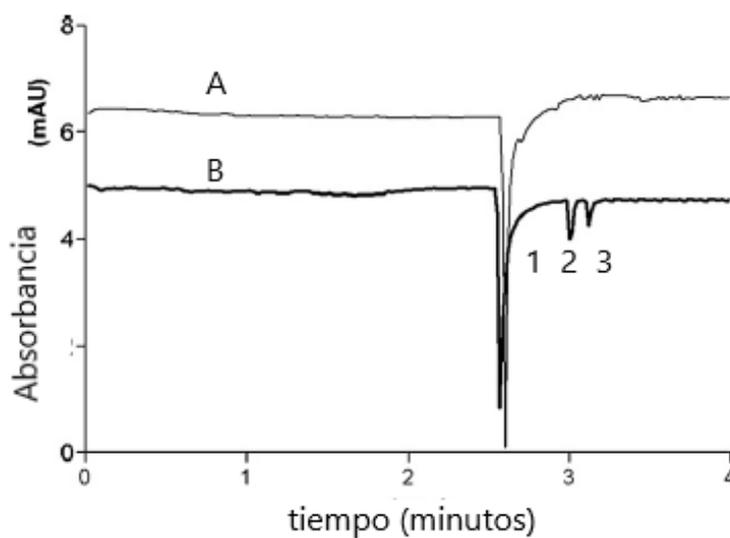


Figura 12. Electroferograma (A) standard ibandronato (B) (1) ibandronato (2) fosfito (3) fosfato. BGE: solución de ácido ftálico $7,5 \text{ mM}$ pH $3,5$. detección UV indirecta a 205 nm

La isoterma de Langmuir fue el modelo utilizado con el fin de caracterizar la interacción del ibandronato con las nanopartículas de sílica. Las isothermas de Langmuir pueden ser expresadas de la siguiente manera:

$$q = q_0 C_{eq} / K + C_{eq}$$

donde q es la capacidad de adsorción expresada como la cantidad de ibandronato adsorbido por unidad de masa de nanopartículas (mg.g^{-1}), K es la constante de equilibrio de adsorción (mg.mL^{-1}), q_0 es la máxima capacidad de adsorción (mg.g^{-1}) y C_{eq} es la concentración de la solución de incubación en el equilibrio (Figura 13).

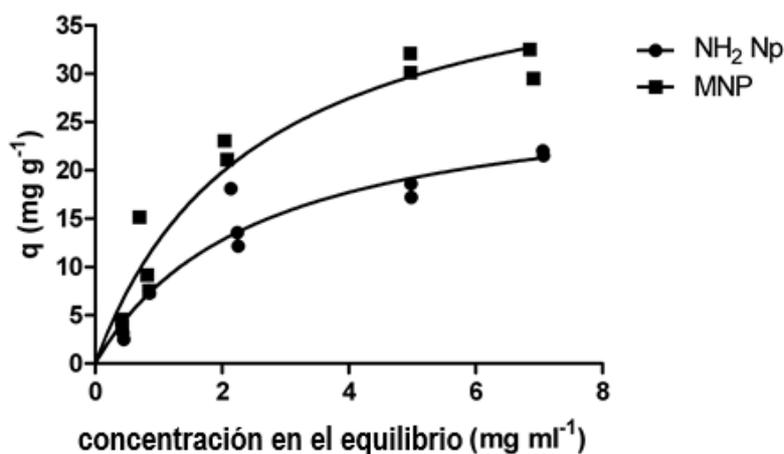


Figura 13. Isotermas de adsorción de ibandronato de sodio para nanopartículas amino modificadas (NH_2 NP) y nanopartículas de sílica mesoporosa (MNP).

Como el ibandronato de sodio tiene los siguientes pKa: 2,0; 6,3 y 10,5 posee carga negativa a pH fisiológico. Con este hecho puede explicarse por qué la carga de nanopartículas de sílica sólidas de un potencial zeta negativo es muy baja (menos de 1 mg.g^{-1}) en comparación con las nanopartículas amino modificadas de sílica que pueden incorporar tanto como $28,90 \pm 3,13 \text{ mg.g}^{-1}$ (por este motivo no se presentan las isotermas correspondientes a las SNP). En este caso, el mecanismo principal de la incorporación del ibandronato podría ser una interacción electrostática entre el fármaco con carga negativa y la superficie positiva de las partículas no porosas. Para las MNP la carga de ibandronato fue aún mayor, con una capacidad máxima de $44,68 \pm 4,86 \text{ mg.g}^{-1}$ que no puede explicarse por interacción electrostática porque también tienen carga negativa, pero si en términos de su alta área superficial. Como las MNP tienen alta porosidad, el fármaco puede quedar atrapado dentro de esos poros.

Como se muestra en la (Figura 14), la liberación del fármaco en los dos tipos de partículas es similar siguiendo una cinética de primer orden y solo un poco más

lento para los MNP. En ambos casos, se observó una rápida liberación, alcanzando casi el 50% después de 5 hs y 100% después de 2 días de incubación.

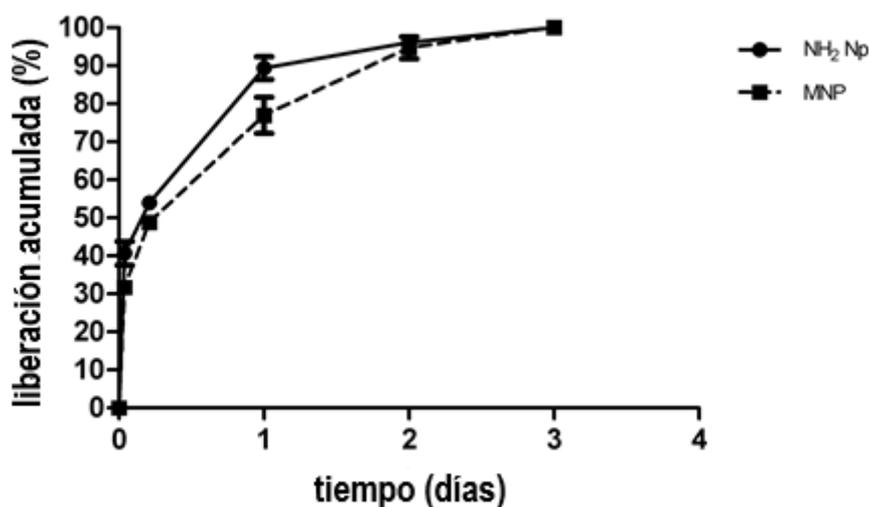


Figura 14. Liberación *in vitro* de ibandronato desde nanopartículas MNP y desde nanopartículas modificadas con grupos amino

3.3. Síntesis y caracterización de compósitos: liberación *in vitro*

Las imágenes SEM mostraron una red típica de colágeno fibrilar con una alta porosidad cuando los hidrogeles de colágeno se prepararon sin la adición de nanopartículas (Figura 15A) y esta red no tuvo cambios después de la incorporación de MNP cargadas con ibandronato de sodio (Figura 15B).

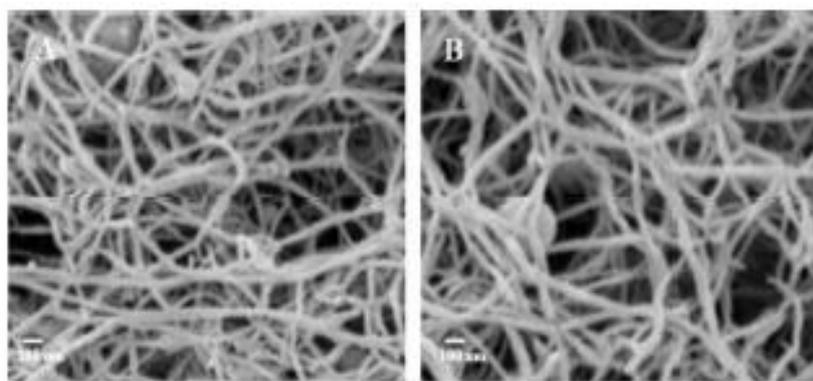


Figura 15. Imágenes SEM de hidrogeles de colágeno puro (A) y compósitos MNP-colágeno (B)

Cuando estas nanopartículas se incorporaron en los hidrogeles de colágeno para preparar compósitos, se observó (Figura 16) que los geles de colágeno puros utilizados como controles y los compósitos con partículas modificadas con grupos amino también tuvieron una liberación rápida, alcanzando casi un 90% en los primeros dos días. Sin embargo, los compósitos de colágeno y MNP mostraron un patrón de liberación diferente, En este caso, el 60% del fármaco se liberó después de 2 días y luego, la liberación se mantuvo durante un período de 10 días. Vale la pena mencionar que en el caso de los compósitos que incluían las nanopartículas modificadas con grupos amino, el fármaco solo se incorpora en la superficie de la partícula ya que no tienen porosidad. Por otra parte, las MNP tienen una gran área superficial y poros, lo que permite que el fármaco se disperse en toda la partícula. En este material, la liberación de los fármacos es por difusión. Por lo tanto, el líquido necesita penetrar dentro del polímero de colágeno en el primer paso y luego tiene que ingresar también en los poros de MNP para permitir al fármaco difundir al medio.

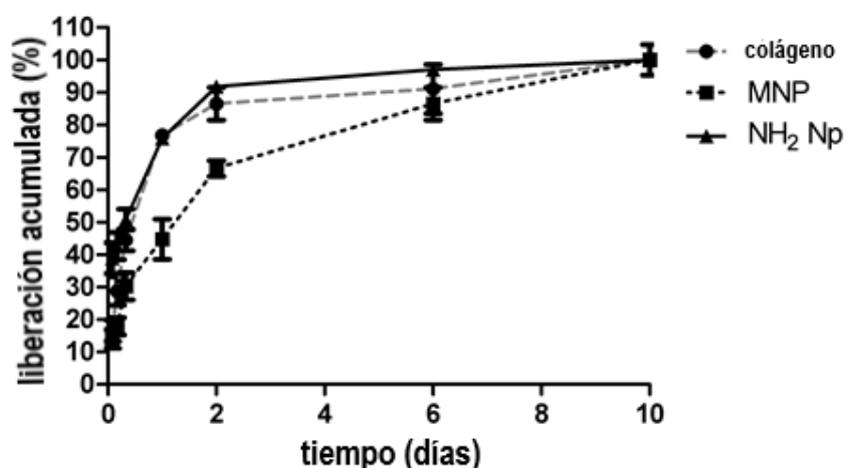


Figura 16. Liberación *in vitro* de ibandronato de sodio desde los compósitos de MNP-colágeno, NH₂ NP-colágeno y desde hidrogeles de colágeno.

3.4. Ensayo de toxicidad y diferenciación celular mesenquimal

Teniendo en cuenta que las MNP tenían una capacidad más alta de incorporación del fármaco y una liberación más lenta cuando fueron incluidas en hidrogeles de colágeno, se decidió realizar solo experimentos celulares con este tipo de NP. Por

lo tanto, se determinó *in vitro* el efecto de las nanopartículas de sílica mesoporosas en varias concentraciones sobre la viabilidad de células SAOS (Figura 17).

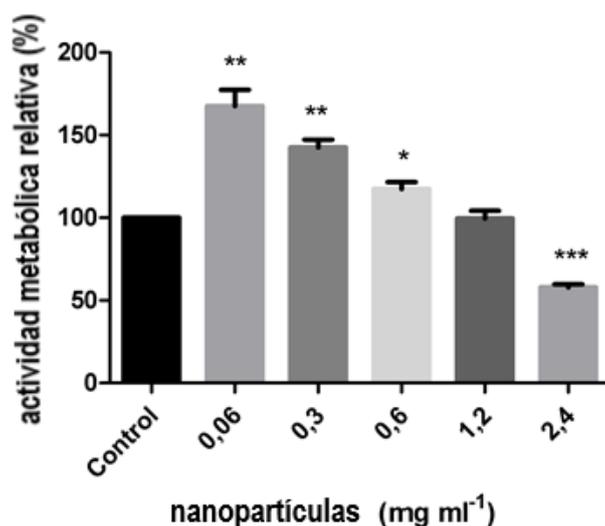


Figura 17. Citotoxicidad de MNP en diferentes concentraciones para células SAOS después de dos días de exposición realizada por el ensayo de MTT representado como porcentaje de viabilidad con respecto a un grupo de control. * Indica una significación estadística en comparación al grupo control.

Estas nanopartículas (sin fármaco) aumentaron significativamente la proliferación celular después de 48 hs en comparación con el control en concentraciones entre 0,06 y 0,6 mg.mL⁻¹. Sin embargo, las nanopartículas en concentraciones superiores a 1,2 mg.mL⁻¹ parecen ser tóxicas para las células, ya que presentaron una disminución del 40% en su viabilidad para 2,4 mg.mL⁻¹. Estos resultados son coherentes con trabajos previos en donde osteoblastos de cultivo primario de rata se colocaron en contacto con los productos iónicos de un vidrio bioactivo con un 60% de sílica, en los cuales aumentó la viabilidad celular en comparación con el control [124].

Posteriormente, se midió la fosfatasa alcalina (ALP) luego de la incubación de células mesenquimales con MNP cargadas o no con ibandronato sódico. Se pudo observar (Figura 18) que el ibandronato sódico (10⁻⁸ M) tuvo un efecto positivo sobre la diferenciación celular ya que la actividad de ALP aumentó significativamente después de 5 y 10 días de cultivo en comparación con el control negativo. Esto fue reportado previamente para la misma concentración de otros bisfosfonatos [125].

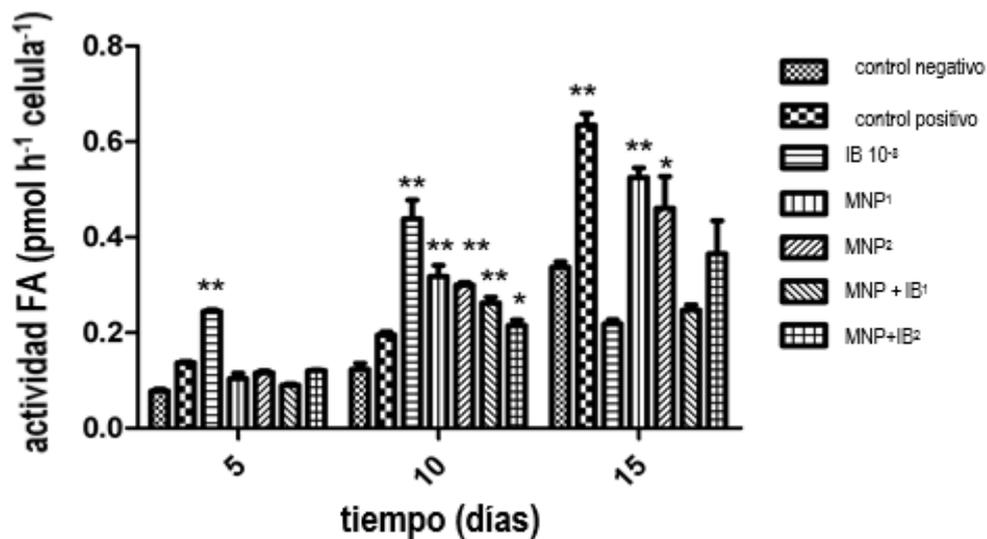


Figura 18. Actividad osteogénica de MNP y MNP con ibandronato de sodio en células mesenquimales midiendo la actividad de fosfatasa alcalina de las células. IB 10^{-8} indica un medio de cultivo con un contenido de ibandronato sódico 10^{-8} M. MNP¹ indica la presencia de $0,36 \mu\text{g L}^{-1}$ MNP, MNP² indica la presencia de $3,6 \mu\text{g L}^{-1}$ MNP, MNP + IB¹ indica la presencia de $0,36 \mu\text{g L}^{-1}$ MNP cargado con 10^{-8} de ibandronato de sodio y MNP + IB² indica la presencia de $3,6 \mu\text{g L}^{-1}$ MNP cargado con 10^{-7} de ibandronato sódico. * Indica una significancia estadística en comparación con el control negativo.

Von Knoch et al., por ejemplo, demostraron que el zoledronato, risedronato y alendronato promueven la diferenciación de células madre de la médula ósea a osteoblastos, proporcionando una mayor evidencia de sus efectos anabólicos en osteoblastos [126]. Del mismo modo, las nanopartículas cargadas con ibandronato en dos concentraciones diferentes (10^{-8} y 10^{-7}) produjeron un aumento en la actividad de ALP después de 10 días de cultivo, probablemente debido al hecho de que la liberación del fármaco es distinta en comparación a la solución de ibandronato, necesitándose mayores tiempos de cultivo para llegar a observar el efecto diferenciador.

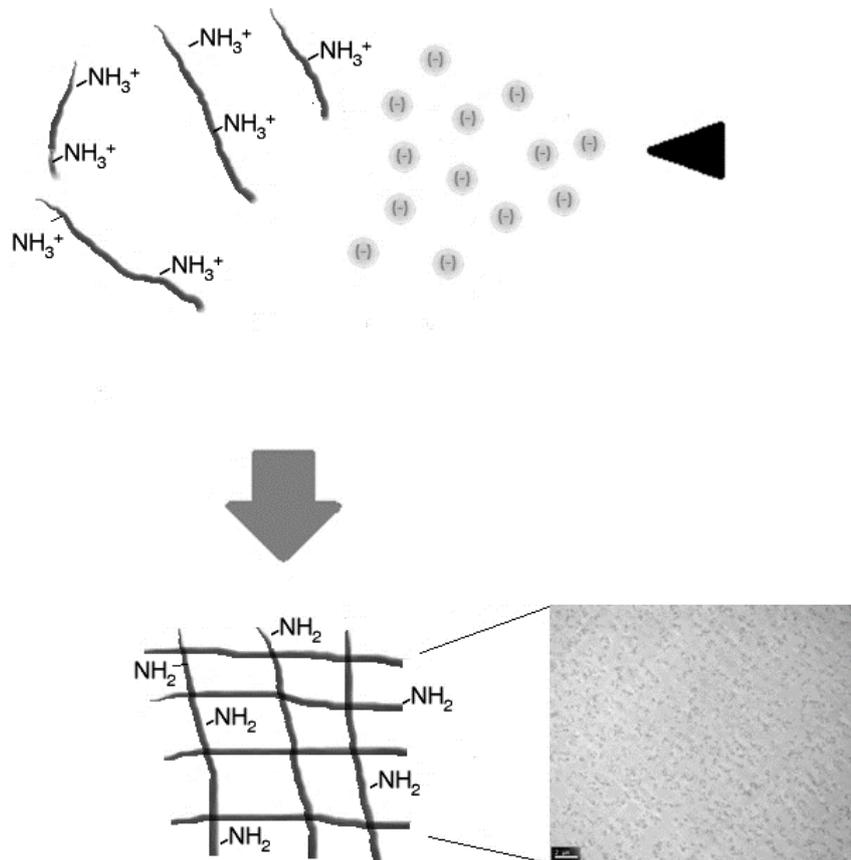
Curiosamente, las MNP también tuvieron un efecto sobre la diferenciación de las células cuando no llevaban el ibandronato de manera similar a otros trabajos previamente publicados [127], y dicho efecto también se retrasó a 10 y 15 días con respecto al control positivo probablemente debido a que la sílica tiene que

solubilizarse previamente desde las nanopartículas para estar disponible en el medio de cultivo de las células y ejercer un efecto sobre ellas.

No se observó ninguna diferencia significativa cuando las dos diferentes concentraciones de nanopartículas de sílica mesoporosas fueron incorporadas a los medios de cultivo. *Ha et al.*, [128] observaron recientemente que una nanopartícula bioactiva basada en sílica en una formulación estimula la diferenciación y mineralización *in vitro* de osteoblastos, y además aumenta la densidad mineral ósea en ratones jóvenes *in vivo* demostrando que estas nanopartículas tienen actividad biológica intrínseca, más allá de su efecto inhibitorio de la actividad osteoclástica por la portación del fármaco ibandronato.

En conclusión, estos compósitos de MNP-colágeno representarían una alternativa valiosa para la administración local sostenida de bisfosfonatos y con uso potencial en la regeneración ósea. De hecho, este sistema combina: i) un efecto inhibitorio bien conocido sobre los osteoclastos [94,95] ii) la capacidad de promover un efecto de diferenciación osteogénica en células mesenquimales y iii) al mismo tiempo no son tóxicas para las células.

CAPÍTULO 3:
DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE HIDROGELES DE
TIMOL-QUITOSANO CON ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA-ANTIOXIDANTE PARA LA
ADMINISTRACIÓN LOCAL ORAL



1. Introducción

Hoy en día, el desarrollo de dispositivos innovadores para la administración de fármacos está centrado en la prevención de los efectos secundarios y en el aumento de los intervalos de dosificación [129]. Una estrategia para evitar los efectos secundarios de la administración sistémica, es el desarrollo de sistemas de administración locales [130–133], por lo tanto, la administración dérmica, por mucosa, ocular y por inhalación puede ayudar a prevenirlos [134,135].

Particularmente, hay algunas características de la mucosa que influyen en el diseño de nuevos sistemas de administración. Las membranas mucosas no poseen una capa externa queratinizada como la piel y por ello son mucho más sensibles a los irritantes. Sin embargo, al tener un buen perfil de permeabilidad, se convierten en un sitio adecuado para la administración de fármacos.

Además, generalmente las enfermedades implican mecanismos complejos y diversos en los que se necesitan varios activos para lograr un tratamiento adecuado. La enfermedad periodontal es un ejemplo. Las bacterias están presentes en todas las etapas de la enfermedad, así como la inflamación del tejido periodontal [136,137]. Por lo tanto, se requieren antimicrobianos, antioxidantes, antirresortivos y anti-inflamatorios a lo largo del tratamiento [32,138–141].

Hoy en día, algunos productos comerciales incluyen enjuagues bucales que se aplican diariamente, antibióticos sistémicos y dispositivos de administración local de fármacos [32,33]. Teniendo esto en cuenta, el timol tiene propiedades antimicrobianas [142–144] y antioxidantes [145] así como las características organolépticas adecuadas para la administración oral local. Sin embargo, es ligeramente soluble en agua y volátil, generando un obstáculo para desarrollar un dispositivo de administración oral.

Por otra parte, el biomaterial quitosano es un polisacárido lineal constituido por glucosamina y N-acetil-glucosamina derivado de crustáceos que tiene buenas perspectivas para aplicaciones biomédicas. Los grupos amino del quitosano pueden establecer interacciones iónicas mientras que los grupos acetamida pueden participar en interacciones hidrofóbicas, dando lugar a un amplio espectro de moléculas candidatas para la liberación de fármacos y una alta capacidad de adsorción [25]. Además, los grupos funcionales del quitosano tales como el hidroxilo y el amino pueden modificarse químicamente [146]. Por ejemplo, la adición de grupos alquilo y carboximetilo al quitosano cambia su aspecto físico, químico y

propiedades mecánicas [147]. Muchos avances han sido logrados en modificaciones químicas y enzimáticas del quitosano. En el caso concreto de las modificaciones enzimáticas, éstas han demostrado alta especificidad utilizando condiciones de reacción favorables al medio ambiente [148].

El quitosano también ha mostrado actividad antimicrobiana [149,150]. Sin embargo, se encuentran algunas discrepancias en la literatura. La actividad antimicrobiana está influenciada por características del polímero como el grado de desacetilación y factores externos como el tipo de microorganismo y el pH. Hay varias hipótesis acerca del mecanismo de acción del quitosano. Algunos autores postulan al quitosano como agente quelante, otros como un polímero policatiónico que se une a las proteínas de la superficie celular aniónica de los microorganismos [151].

Además, se ha estudiado la citocompatibilidad del quitosano en muchos tipos de células como osteoblastos, fibroblastos y células neuronales [152–154]. Estas células pudieron adherirse y proliferar en la matriz de quitosano mostrando una buena biocompatibilidad. Algunos autores sostienen que la homología entre el biopolímero de quitosano y ácido hialurónico nativo u otras glucosaminas extracelulares podrían ser una de las razones de su biocompatibilidad [155]. Dada su biocompatibilidad, el quitosano y sus compósitos se consideran buenos candidatos para la ingeniería de tejidos y la curación de heridas [156–158].

Además, el quitosano es un polímero biodegradable. De hecho, se sabe que la lisozima y otras enzimas pueden degradar el quitosano en productos no tóxicos. Esto es bastante interesante porque los andamios y dispositivos de administración biodegradables tienen aplicaciones clínicas prometedoras, ya que generalmente muestran buena aceptación del paciente [159].

Por último, el quitosano es un polímero mucoadhesivo [155,160,161]. La mucoadhesión es un proceso en el que se establecen interacciones químicas entre la mucina y el biopolímero. La naturaleza de estas interacciones difiere según las características del biopolímero. El proceso de mucoadhesión se puede dividir en dos eventos diferentes. Primero, el polímero se moja y se expande en la red de mucina. Luego, se establecen enlaces covalentes, interacciones iónicas y de puente de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y electrostáticas entre el polímero y la mucina. En el caso del quitosano, los grupos amino e hidroxilo forman puentes de hidrógeno con la mucina y su estructura lineal da una buena flexibilidad al polímero,

estimulando la mucoadhesión [162]. En conclusión, el quitosano tiene buenas cualidades para el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos y de regeneración tisular [163,164].

En particular, los hidrogeles de quitosano se pueden usar como carriers para la liberación de fármacos y también como un andamio biodegradable para la regeneración del tejido periodontal. En el tratamiento de la enfermedad periodontal, no solo es importante tratar los signos y síntomas, sino también la recuperación del tejido perdido. Hoy en día, la recuperación completa del tejido periodontal todavía parece demasiado lejos de lograr. Sin embargo, se han realizado importantes avances en la regeneración ósea alveolar gracias a materiales cerámicos como la sílica, la hidroxiapatita y el fosfato de calcio [165,166] porque los materiales cerámicos pueden comportarse como materiales bioactivos que fomentan la formación de hueso [167]. Además, hay un desarrollo creciente en la regeneración de tejidos blandos periodontales con materiales orgánicos como colágeno y quitosano [168–170].

En este capítulo, un hidrogel de quitosano desarrollado por un método de spray con propiedades reológicas, un comportamiento de hinchamiento y una estructura porosa adecuada para la liberación de fármacos se presenta como una alternativa para el tratamiento de la enfermedad periodontal. Desarrollamos la transición sol-gel con una solución alcalina y le incorporamos timol, un compuesto con propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Se realizaron ensayos de citocompatibilidad con fibroblastos [3T3] de ratón confirmando su biocompatibilidad. Además, se evaluó el grado de incorporación de timol en la red polimérica de quitosano, su cinética de liberación, así como sus actividades antimicrobianas y antioxidantes con el objeto de buscar un biomaterial con propiedades antimicrobianas y antioxidantes para tratar la enfermedad periodontal.

2. Experimental

2.1. Reactivos y materiales

El quitosano de baja viscosidad obtenido de cangrejo con una viscosidad estructural 66 mPas y desacetilación >75,0%, la lisozima de huevo de gallina blanco (100.000 U/mg), el reactivo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, el DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), el DAB (tetrahidrocloruro de diaminobencidina), la epinefrina y el timol >98,5% se compraron de Sigma-Aldrich (St Louis, USA). El

reactivo de Folin-Ciocalteu se obtuvo de Merck (Darmstadt, Alemania). El medio de Eagle modificado por Dulbecco, el suero fetal bovino, la penicilina y la estreptomicina se compraron a Gibco. El caldo Todd- Hewitt se obtuvo de Britania Lab. Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

2.2. Síntesis del hidrogel de quitosano

Se preparó una solución de $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dispersando el quitosano en polvo en ácido acético al 1% (v/v). Se agitó durante 15 minutos para obtener así una dispersión homogénea. Luego, 1 mL de solución de quitosano se vertió en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos, utilizada como molde. Luego, se roció con una solución de NaOH 1 N y se dejó durante 5 hs a temperatura ambiente. Finalmente, se eliminó la solución de NaOH y los hidrogeles obtenidos se lavaron con agua desionizada hasta que se alcanzó un pH neutro.

2.3. Caracterización ultraestructural del hidrogel de quitosano

Los hidrogeles de quitosano se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Por tal motivo, las muestras se fijaron con una solución de glutaraldehído (10% v/v en PBS) durante 1 h a 4°C . Después de la fijación, las muestras se lavaron tres veces con PBS y luego se congelaron a -80°C . Finalmente, las muestras fueron liofilizadas y recubiertas de oro para su análisis con un microscopio Zeiss SUPRA 40.

El análisis del microscopio electrónico de transmisión (TEM) se realizó en un MET Zeiss 109. Después de la fijación y el lavado como se describe anteriormente, las muestras se fijaron posteriormente usando un tetraóxido de osmio al 5% en un buffer de cacodilato/sacarosa (0,05 M/0,3 M) con un pH de 7,4 durante 1 h a 4°C . Posteriormente, las muestras se deshidrataron e incluyeron en resina epoxi. Las secciones delgadas se cortaron con un ultra micrótomo y se contrastaron con ácido fosfotúngstico. Las secciones recuperadas fueron fotografiadas.

2.4. Caracterización por FT-IR

Los espectros infrarrojos de transformada de Fourier (FTIR) de los hidrogeles de quitosano liofilizados se llevaron a cabo con un FTIR-Raman Thermo Scientific Nicolet modelo 50 IS, combinado con un dispositivo de ATR. El rango de escaneo fue $4000\text{-}500 \text{ cm}^{-1}$. Los espectros fueron procesados por el software Thermo Nicolet OMNIC.

2.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se realizaron mediciones de calorimetría diferencial de barrido (DSC) en un instrumento Shimadzu DSC-50. La temperatura fue calibrada con In (157 °C, 3.3 J mol⁻¹). Aproximadamente 20 mg de muestra liofilizada se equilibró primero a 25 °C y luego se calentó de 25 a 240 °C a una velocidad constante de 10 °C.min⁻¹, bajo un flujo de nitrógeno de 50 mL.min⁻¹.

2.5 Perfil de hinchamiento

Los hidrogeles de quitosano y timol-quitosano se liofilizaron, se pesaron (W_0) y se almacenaron en buffer fosfato salino (PBS) para permitir la absorción de agua. Posteriormente, los hidrogeles se pesaron (W) en diferentes momentos (t) después de eliminar el exceso de buffer. El grado de hinchamiento se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$W\% = [(W - W_0) / W_0] \times 100$$

Más tarde, el contenido de agua en equilibrio (W_∞) y las constantes de velocidad se calcularon de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$t/W = 1 / (KW^2_\infty) + t/W_\infty$$

donde t es el tiempo

2.7. Medidas reológicas

Primero se realizaron barridos de amplitud para determinar el rango viscoelástico lineal (LVR). Luego, mediante ensayos de corte dinámico se obtuvieron el módulo elástico o de almacenamiento, G' , el módulo viscoso o de pérdida, G'' y la viscosidad compleja (η^*) en función de la frecuencia (ω), en un rango de 0,1 a 500 s⁻¹ de los materiales estudiados usando un reómetro rotacional de Anton Paar (MCR-301) provisto con una cámara termotastizada CTD 600. Las pruebas se realizaron usando placas paralelas de 25 mm de diámetro, una tensión de $\gamma = 1,0\%$. Las mediciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente (20°C) y todas las pruebas se realizaron utilizando deformaciones pequeñas para garantizar la linealidad de las respuestas dinámicas. Todas las medidas se repitieron usando diferentes muestras. El ancho de espacio utilizado fue de 1,8-2 mm.

2.8. Biodegradabilidad del quitosano

Los hidrogeles de quitosano y timol-quitosano se liofilizaron y pesaron (W_0). Luego, se sumergieron en buffer fosfato salino (PBS) con 1 mg.ml⁻¹ de lisozima (100.000

U.mg) a 37 °C. Después de 7 días, los hidrogeles se lavaron, liofilizaron y pesaron ($W_{7 \text{ días}}$). El porcentaje de peso se determinó para evaluar la biodegradación del hidrogel según la siguiente ecuación:

$$W\% = (W_{7 \text{ días}} / W_0) \times 100$$

2.9. Prueba de viabilidad y cultivo celular

Las células [3T3] de fibroblastos de ratón se cultivaron en botellas de cultivo adherentes con medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) con bajo contenido de glucosa complementado con un 10% de suero fetal bovino inactivado por calor y un 1% de penicilina-estreptomicina. Las células se mantuvieron a 37°C en una cámara de dióxido de carbono al 5% humidificado hasta que se alcanzó la confluencia. La disrupción y remoción celular se realizó con una solución de tripsina-EDTA. Las células se tiñeron con azul tripán y se contaron en una cámara Neubauer. Las células de fibroblastos ($1,22 \times 10^4$) fueron sembradas en cada hidrogel seguido por la adición de 1 mL de medio completo DMEM de baja glucosa. Después de 24 hs de incubación a 37°C, en un 5% de CO₂ la actividad metabólica celular se midió usando el ensayo de MTT.

Para ello, el medio se eliminó y se reemplazó por 1 mL de una solución 0,5 mg·mL⁻¹ de MTT en medio fresco. Las muestras fueron incubadas en una cámara humidificada al 5% de dióxido de carbono por 4 hs. Posteriormente, se eliminaron las soluciones, se añadió 1 mL de etanol absoluto y las mezclas se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente para solubilizar el precipitado azul. La absorbancia se registró a 570 nm en un espectrofotómetro UV-Visible (Cecil CE 3021, Cambridge, Inglaterra)

2.10. Carga y liberación de timol

Los hidrogeles de quitosano se incubaron en soluciones hidroalcohólicas de timol (2,5 mg·mL⁻¹ y 1,25 mg·mL⁻¹) durante 7 hs. Los hidrogeles se lavaron con agua y después de eso 1 mL de buffer fosfato salino (PBS) o saliva artificial Fusayama Meyer modificada (NaCl 6,8 mM, KCl 5,4 mM, CaCl₂ 5,4 mM, Na₂HPO₄ 1,6 mM, urea 16 mM) (AS) se agregó a cada hidrogel para realizar el ensayo de liberación. El medio de liberación fue eliminado en diferentes tiempos de los hidrogeles y se repuso con medio nuevo. La liberación acumulada de timol se midió a través del método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu, ampliamente utilizado para

determinar el contenido de polifenoles y fenoles. Brevemente, se mezclaron 200 μL de sobrenadante de cada hidrogel con 200 μL de reactivo y 2 mL de solución de Na_2CO_3 (2% p/v). Después de 1 h de incubación, cada muestra se midió a 725 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Cecil CE 3021, Cambridge, Inglaterra).

2.11. Prueba de viabilidad de células bacterianas

2.11.1. Ensayo MTT y análisis SEM

Los hidrogeles de quitosano se incubaron en anaerobiosis a 37°C en caldo Todd-Hewitt con 5% de glucosa con 1×10^6 UFC de *Streptococcus mutans*. Después de 24 hs, en algunos hidrogeles se añadió el reactivo MTT (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en PBS) dado que el *Streptococcus mutans* reduce el colorante MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) en formazán púrpura insoluble. Luego de la incubación, estos hidrogeles de quitosano se disolvieron en ácido acético al 1% (V/V) y se realizaron diluciones posteriores en etanol. Las soluciones coloreadas debido a la disolución de los cristales de formazán se midieron a 570 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Cecil CE 3021, Cambridge, Inglaterra). En paralelo, otros hidrogeles se fijaron y se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) como se describe en la Sección 2.3.

2.12. Prueba de actividad antimicrobiana

2.12.1. Método de conteo de placas

Se añadió una suspensión bacteriana de $1 \cdot 10^6$ UFC. mL^{-1} en PBS o AS a los hidrogeles de quitosano cargados con timol. Los hidrogeles fueron incubados a 37°C. Después de 24 hs se retiró la suspensión bacteriana de los hidrogeles y se realizaron diluciones en serie en solución fisiológica de cada sobrenadante. Finalmente, 20 μL de cada solución se extendieron en placas de agar y se contó el número de unidades formadoras de colonias. Esta metodología se repitió dos veces más, para evaluar el efecto antimicrobiano de los materiales sintetizados después de 24 hs, 48 hs y 72 hs. Para *Staphylococcus aureus* se utilizaron placas de agar Luria-Bertani (LB) (extracto de levadura, 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; agar, 15 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; NaCl, 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y triptona, 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) mientras que para *Streptococcus mutans*, placas de agar sangre en condiciones anaeróbicas.

2.13. Actividad antioxidante

2.13.1. Ensayo DPPH

La actividad scavenger del radical libre estable DPPH fue analizada por el método modificado de Blois en el que la tasa de blanqueo de DPPH es monitoreada a una longitud de onda característica en presencia de la muestra [171]. El ensayo se realizó de la siguiente manera: 100 μL de sobrenadante de los hidrogeles de quitosano cargados con timol se mezclaron con 400 μL de buffer Tris pH= 7,4 y 500 μL de DPPH 100 μM . La absorbancia se midió a 517 nm. La inhibición DPPH fue calculada por la ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = [1 - (A_{\text{muestra}}/A_{\text{DPPH}})] \times 100$$

donde A es la absorbancia medida.

2.13.2. Simil actividad peroxidasa

La actividad simil peroxidasa de los hidrogeles timol-quitosano se realizó por el método descrito por Herzog y Fahimi [172]. Después de su síntesis e incorporación de timol, 200 μL de los sobrenadantes de los hidrogeles se mezclaron con 25 μL de H_2O_2 0,030 M y 775 μL de tetrahidrocloruro de diaminobencidina (DAB) $1 \cdot 10^{-4}$ M preparado en buffer Krebs-Henseleit (pH= 7,4) que contiene: NaCl 125 mM; KCl 4,0 mM; NaH_2PO_4 0,5 mM; 0,1 mM MgCl_2 ; CaCl_2 1,1 mM y glucosa 5,0 mM. Una solución de DAB sin H_2O_2 se usó como blanco de reacción. La reacción fue iniciada por H_2O_2 y el cambio en las lecturas de absorbancia se registró a intervalos de 30 segundos durante 5 minutos usando un espectrofotómetro de Shimadzu UV- 240 (impresora gráfica PR-1) ajustado a 465 nm. La absorbancia Δ/min fue calculada y una curva de calibración de la concentración de peroxidasa frente al $\Delta\text{absorbancia}/\text{min}$ se realizó usando peroxidasa de rábano picante de concentración conocida, obteniendo una relación lineal en el rango de $1,95 \times 10^{-3}$ a $2,5 \times 10^{-5}$ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$. La actividad de las muestras fue calculada por interpolación en la curva estándar.

2.13.3. Actividad simil superóxido dismutasa

La actividad simil superóxido dismutasa fue determinada por la capacidad de inhibir la autooxidación de epinefrina a adrenocromo, en presencia del oxígeno de la atmósfera [173]. Para este propósito, se mezclaron 50 μL del sobrenadante del hidrogel, 910 μL de buffer fosfato pH=10,7 y 40 μL de epinefrina 2 mM. La

absorbancia resultante se midió a 480 nm cada 10 segundos durante 5 minutos. La Δ absorbancia/min se calculó y se evaluó la actividad antioxidante de las muestras como el % de inhibición de la autooxidación de epinefrina mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = [(\Delta\text{Abs}/\text{min}_{\text{epinefrina}} - \Delta\text{Abs}/\text{min}_{\text{muestra}}) / \Delta\text{Abs}/\text{min}_{\text{epinefrina}}] \times 100$$

2.14. Análisis estadístico

Los datos se representan como medias \pm SD de experimentos de al menos triplicados. Para algunos datos, las diferencias se analizaron mediante ANOVA (análisis de varianza), seguido de una prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Para otros datos, se realizó la prueba t de Student. En cada estadística $p < 0,05$ se consideró como significativo.

3. Resultados y discusión

3.1. Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano

Los hidrogeles de quitosano se sintetizaron mediante un método de spray. La gelificación inmediata se logró por la rápida neutralización de las cadenas multicatiónicas de quitosano mediante la aplicación de hidróxido de sodio 1 M (Figura 19).

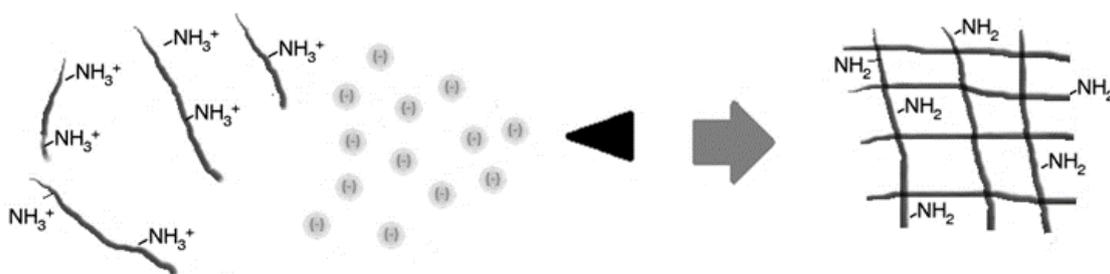


Figura 19. Representación esquemática de la síntesis de los hidrogeles de quitosano

La preparación de hidrogeles de quitosano por esta técnica garantiza una estructura porosa y una gran superficie, propiedades altamente deseables para mejorar la adhesión, la proliferación celular y mejorar la incorporación de principios activos. La homogeneidad de la red polimérica, la estructura de poros y el tamaño de poro aproximado se observaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de transmisión electrónica (TEM) (Figura 20).

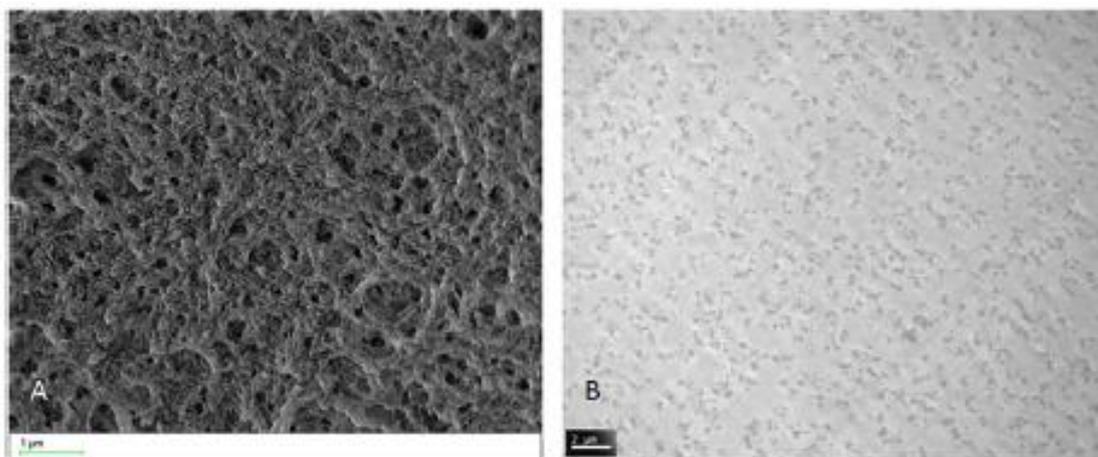
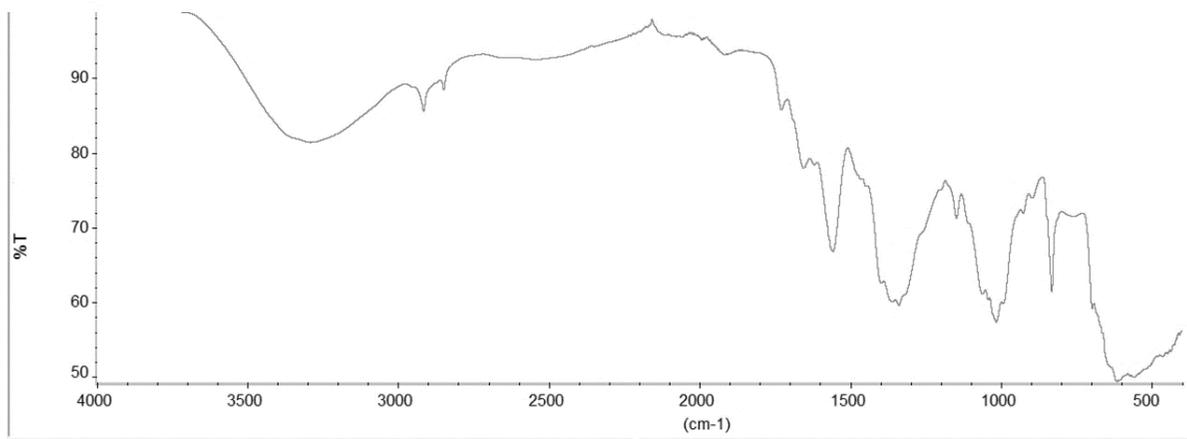


Figura 20. (A) Imagen SEM representativa del hidrogel de quitosano (B) Imagen TEM representativa del hidrogel de quitosano

Además, el espectro infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR) mostró un pico a 1550 cm^{-1} correspondiente al pico de la flexión (N-H) y el pico de la amida I a 1650 cm^{-1} (C=O). También se observó una banda ancha en $3500\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ que podría atribuirse a vibraciones de estiramiento (N-H) y (O-H). El espectro FTIR obtenido es consistente con un quitosano de alto grado de desacetilación [153] (**Figura 21A**). También se realizó un análisis de calorimetría de barrido diferencial. Esta técnica ampliamente utilizada para la caracterización de polímeros tiene la capacidad de determinar cambios físicos y químicos en biopolímeros como el quitosano. En el termograma DSC (**Figura 21B**), se observó un pico endotérmico característico a $126,7^{\circ}\text{C}$, que se puede atribuir a la pérdida de agua [174]. Este resultado implica que hay una fracción de agua presente en el hidrogel y está estrechamente asociado a la matriz del polisacárido [175,176].

A



B

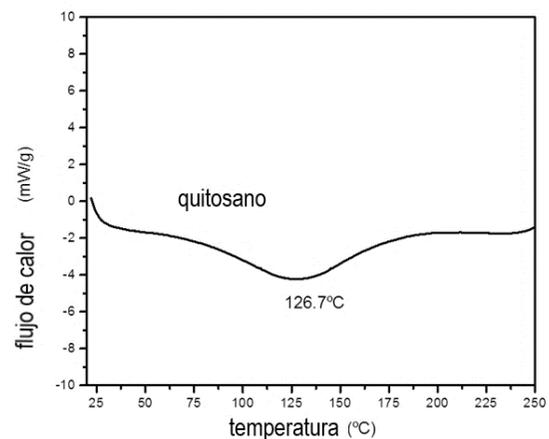


Figura 21. (A) Espectro FTIR de los hidrogeles de quitosano (B) Termograma DSC de los hidrogeles de quitosano a una velocidad de calentamiento de 10°C.min⁻¹ bajo un flujo de nitrógeno de 50 mL.min⁻¹

Posteriormente, se realizaron estudios de hinchamiento a los hidrogeles de timol- quitosano (Figura 22A). Los hidrogeles de quitosano cargados con timol mostraron buenas propiedades de hinchamiento, este proceso siguió una cinética de segundo orden y absorbieron una gran cantidad de agua (Figura 22B).

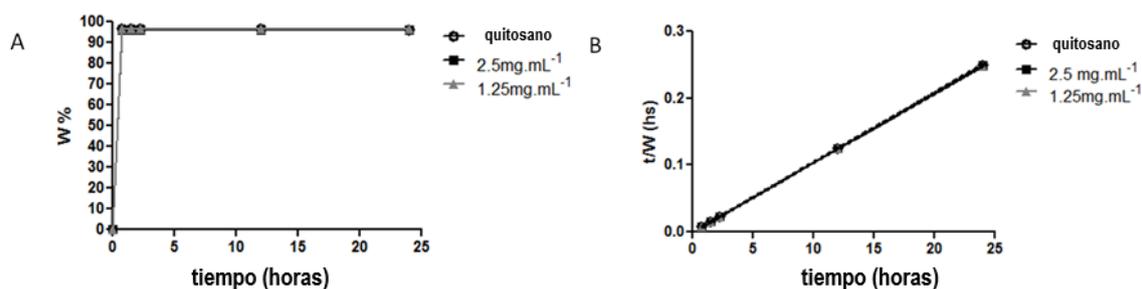


Figura 22. (A) Estudios de hinchamiento de los hidrogeles de quitosano y timol-quitosano durante un periodo de 24 hs en PBS (n = 6) (B) Datos experimentales del contenido de agua y tiempo trazados de acuerdo con una cinética de segundo orden (n = 6) de los hidrogeles de quitosano y timol-quitosano

El perfil de hinchamiento del hidrogel revela que casi en 1 hora se alcanzó el equilibrio. En la Tabla 1, se detalla el contenido de agua en equilibrio de los hidrogeles de quitosano e hidrogeles de timol-quitosano, alcanzando hasta ~ 96% de agua (Tabla 1).

Tabla 1. Contenido de agua en el equilibrio (W_{∞}) de los hidrogeles de quitosano y timol-quitosano y el coeficiente de determinación (r^2) del contenido de agua de acuerdo con una cinética de segundo orden

	r^2	W_{∞}
quitosano	0.9998	96.12
2.5mg.mL ⁻¹	0.9998	96.25
1.25mg.mL ⁻¹	0.9999	96.62

Vale la pena mencionar que es sabido que los hidrogeles que tienen un alto contenido de agua muestran una buena biocompatibilidad, una clara ventaja para aplicaciones médicas [177].

Además, los estudios reológicos indicaron que el quitosano era un hidrogel predominantemente elástico, debido a que los valores del módulo de almacenamiento G' (aprox. 1000 Pa) fueron siempre mayores que los valores del módulo de pérdida G'' (aprox. 100 Pa) [178] (Figura 23B). Los hidrogeles predominantemente elásticos generalmente tienen un buen comportamiento de hinchamiento. Por lo tanto, las propiedades viscoelásticas de los hidrogeles de quitosano concuerdan con su perfil de hinchamiento.

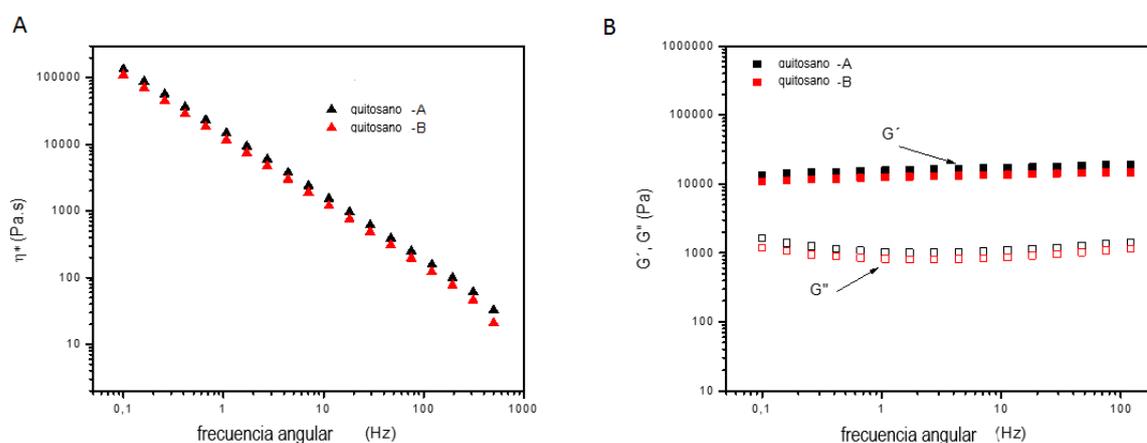


Figura 23. (A) Viscosidad compleja de los hidrogeles de quitosano frente a la frecuencia (B) Respuesta viscoelástica de los hidrogeles de quitosano frente a la frecuencia (G' y G''). (N = 2)

En resumen, las propiedades viscoelásticas, el perfil de hinchamiento y los resultados de DSC indican que los hidrogeles de quitosano tienen una gran afinidad por el agua, favoreciendo la mucoadhesión del quitosano a la mucosa oral. En efecto, el agua representa casi el 95% del peso de la capa mucosa.

La biodegradabilidad del quitosano también se evaluó. Especialmente porque la saliva es un líquido que contiene varios electrolitos y proteínas como la lisozima, que es capaz de degradar el quitosano ya que puede hidrolizar enlaces β -1,4 entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetil-D-glucosamina. Después de 7 días de incubación, los hidrogeles de quitosano cargados con timol fueron degradados por la lisozima en un \sim 10% (Figura 24).

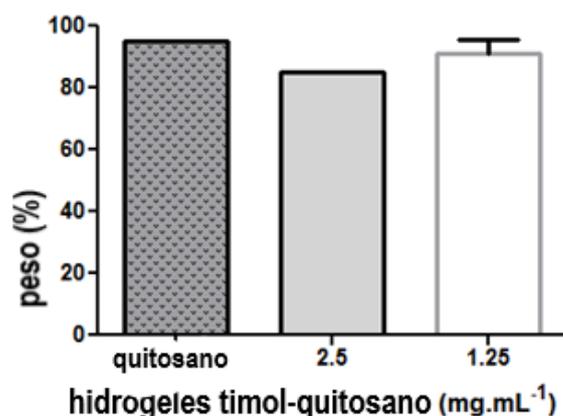


Figura 24. Biodegradación de hidrogeles de timol-quitosano en 7 días con 1 mg.mL⁻¹ de lisozima en PBS.

3.2. Estudios de biocompatibilidad con hidrogeles de quitosano y estudios de liberación de timol

Una vez que se caracterizaron los hidrogeles de quitosano, se prepararon los ensayos de citocompatibilidad con fibroblastos [3T3]. Los fibroblastos generalmente se encuentran en el tejido conectivo y son los responsables de la síntesis de colágeno, glicoproteínas y otros componentes de la matriz extracelular. Por lo tanto, tienen un papel importante en la regeneración de los tejidos blandos. Los resultados de MTT mostraron que los hidrogeles son citocompatibles durante al menos 24 hs, por lo que son factibles para ser utilizados como andamios celulares. La cantidad de células viables sembradas en los hidrogeles de quitosano aumentó aproximadamente 4 veces después 24 hs. ($p < 0,05$) (Figura 25).

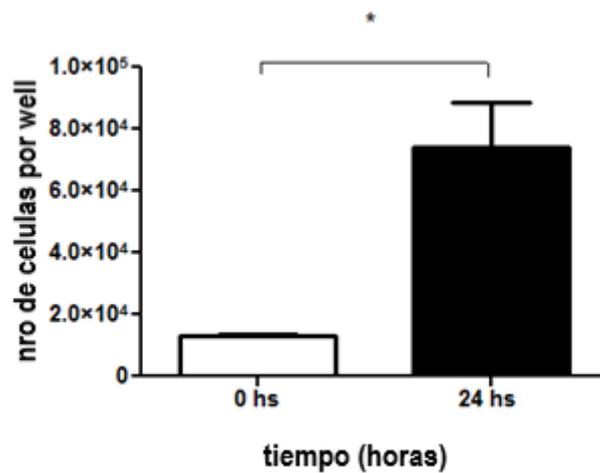


Figura 25. La citocompatibilidad con fibroblastos 3T3 durante 24 hs en los hidrogeles de quitosano (n = 3) * p <0,05 se consideró significativa mediante la prueba t de Student

Debido a su alto grado de desacetilación, el quitosano está compuesto principalmente por residuos de glucosamina que exhiben una gran cantidad de grupos amino e hidroxilo que están disponibles para la formación de puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas con el grupo fenol del timol. Por lo tanto, podría hipotetizarse que el timol podría unirse al quitosano por enlaces no covalentes, como interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno. Además, la porosidad del hidrogel de quitosano fomenta la proximidad entre los grupos funcionales que conducen a la formación de estos tipos de enlaces, aumentando así la incorporación de timol. Los hidrogeles de quitosano incubados con soluciones de 2,5 mg.mL⁻¹ y 1,25 mg.mL⁻¹ de timol incorporaron (0,99 ± 0,03) mg y (0,57 ± 0,03) mg por hidrogel (20 mg) respectivamente.

Posteriormente, la liberación acumulada de timol se llevó a cabo en dos diferentes medios de liberación (**Figura 26**).

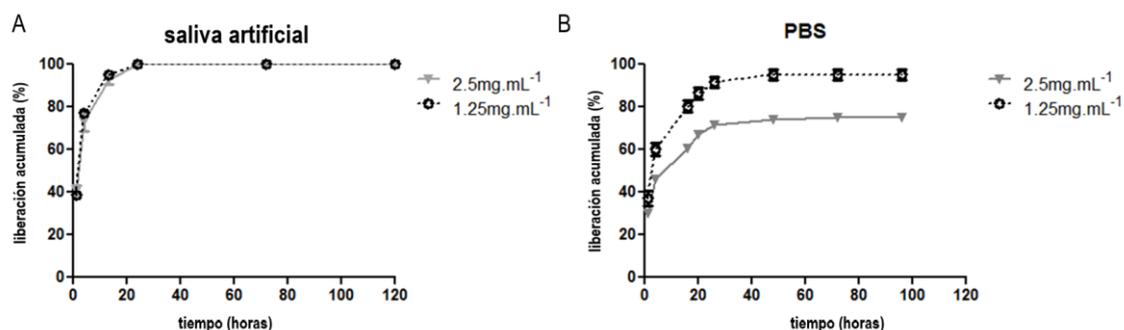


Figura 26. Liberación acumulativa de timol en saliva artificial y PBS desde los hidrogeles de quitosano (n = 3)

Después de 4 hs, aproximadamente un 70% de timol se liberó en el medio AS en contraste a lo observado en PBS, en el que el contenido de timol liberado al medio fue ~45%. En el buffer PBS, que se usa frecuentemente para las medidas de liberación *in vitro* de fármacos porque se asemejan a las condiciones fisiológicas, el 100% de liberación de timol se logró en casi 48 hs.

En la saliva artificial Fuyasama Meyer modificada [179], cuya composición se asemeja aún más a la saliva natural, la liberación de timol fue incluso más rápida, alcanzando casi el 100% después de 24 hs. Sin embargo, ambos medios, PBS y AS, mostraron perfiles similares de liberación *in vitro* siguiendo una cinética de primer orden. Los estudios de liberación sugieren que los hidrogeles podrían usarse como carriers de timol para una terapia antioxidante-antimicrobiana teniendo en cuenta su aplicación periódica por el paciente en intervalos de 2-3 días.

3.3. Viabilidad de células bacterianas en hidrogeles de quitosano y estudios de la actividad antimicrobiana

La literatura sostiene que el quitosano tiene actividad antimicrobiana. Sin embargo, varios factores pueden tener un impacto en el comportamiento del quitosano. Por ello, decidimos evaluar de diferentes maneras la actividad antimicrobiana del quitosano.

En primer lugar, empleamos un ensayo de MTT para analizar la viabilidad de células bacterianas en hidrogeles de quitosano [180] con o sin activo durante 24 hs en caldo Todd-Hewitt con 5% de glucosa. La viabilidad del *Streptococcus mutans* fue significativamente mayor en los hidrogeles de quitosano que los hidrogeles de quitosano que se incubaron con timol ($p < 0,05$) (Figura 27).

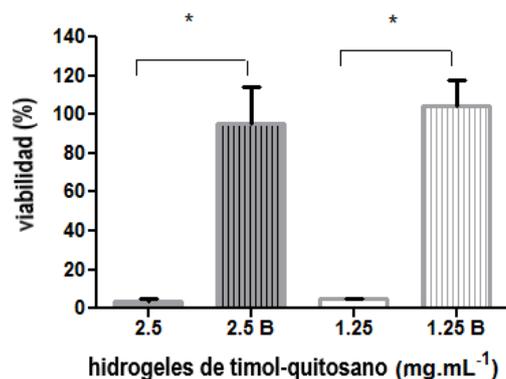


Figura 27. Viabilidad de *Streptococcus mutans* en hidrogeles de timol-quitosano por ensayo de MTT después de 24hs (n = 3). Las diferencias se analizaron mediante ANOVA, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni, $p < 0,05$ se consideró significativo. B es el hidrogel de quitosano sin timol.

En segundo lugar, se realizó un análisis de microscopía electrónica de barrido para evaluar la agregación de *Streptococcus mutans* en los hidrogeles de quitosano con y sin timol después de 24 hs de incubación en caldo Todd-Hewitt con glucosa al 5%. Como era de esperar, no se encontraron bacterias en los hidrogeles de quitosano cargados con timol mientras que en los hidrogeles de quitosano sin timol se observaron altas cantidades de bacterias adheridas (**Figura 28**). Las imágenes SEM confirman aún más que la adhesión y la agregación de bacterias fue desfavorecida en los hidrogeles de quitosano cargados con timol. Los resultados de ambas técnicas sostienen que los hidrogeles de quitosano sin timol son matrices adecuadas para la agregación y proliferación de *Streptococcus mutans* a diferencia de los hidrogeles de quitosano cargados con timol, en los que no hay agregación o proliferación.

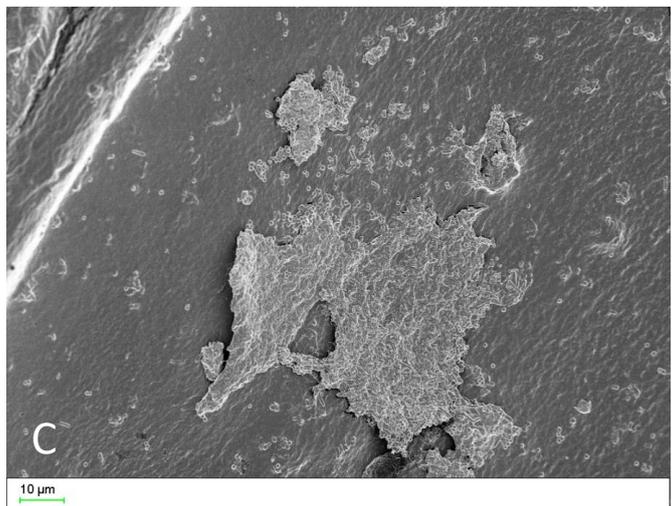
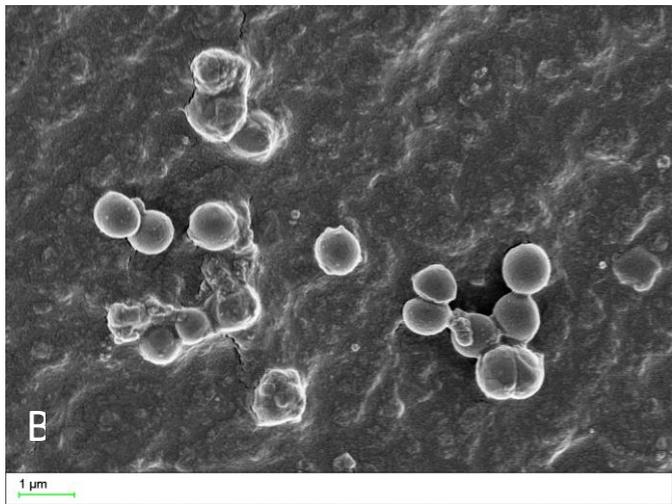
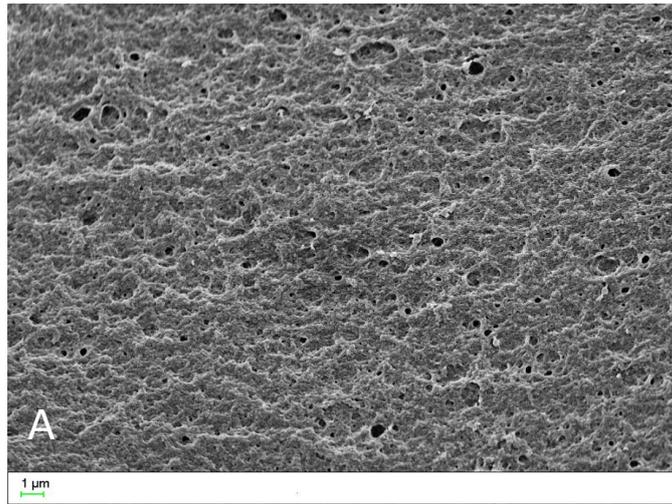


Figura 28. (A) Imagen SEM del hidrogel de quitosano (B) Imagen SEM de *Streptococcus mutans* sobre hidrogel de quitosano (C) Imagen SEM del biofilm de *Streptococcus mutans* sobre hidrogel de quitosano

En tercer lugar, se evaluó la actividad antimicrobiana de los hidrogeles de timol-quitosano en PBS y en saliva artificial mediante el método de conteo de placas (Figura 29).

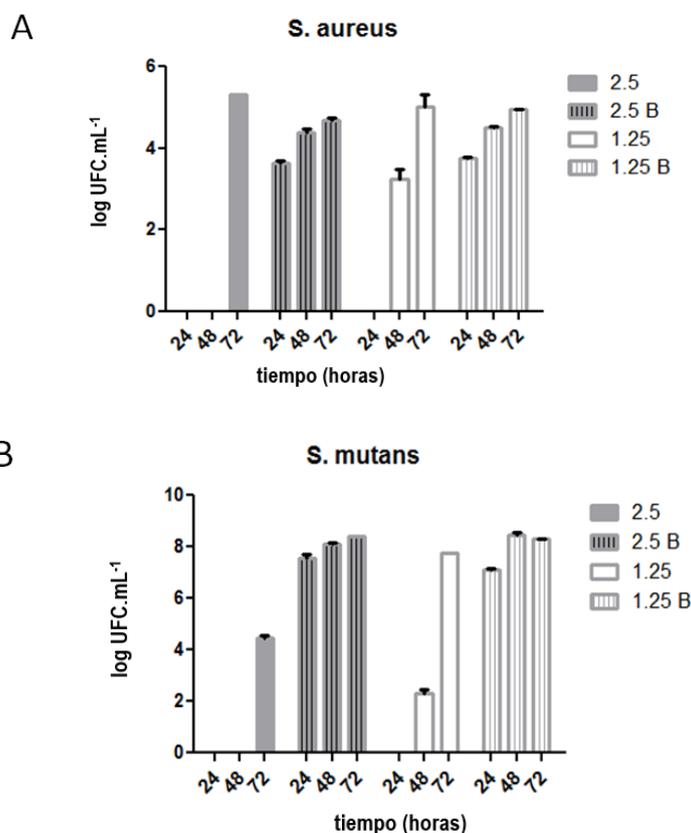


Figura 29. (A) Actividad antimicrobiana de hidrogeles de timol-quitosano contra *Staphylococcus aureus* por el método de recuento en placas durante un período de 72 hs (n = 3) en PBS (B) Actividad antimicrobiana de hidrogeles de timol-quitosano contra *Streptococcus mutans* por el método de recuento en placas durante un período de 72 hs (n = 3) en saliva artificial.

En los hidrogeles de quitosano sin timol se observó la proliferación de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* en cada ciclo de reutilización. La ausencia de actividad antimicrobiana en los hidrogeles de quitosano sin timol podría atribuirse a la neutralización de los grupos amino durante el proceso de gelificación. Con lo cual, el quitosano no puede comportarse como un grupo de cadenas policatiónicas que podrían ser las responsables de su actividad antimicrobiana. Por el contrario, los hidrogeles de quitosano cargados con timol mostraron una actividad antimicrobiana significativa contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* durante 3 ciclos consecutivos de reutilización de 24 hs incubado en PBS o

AS respectivamente confirmando que los hidrogeles de timol-quitosano presentan una actividad antimicrobiana efectiva durante 72 hs.

Cabe aclarar que la bacteria *Staphylococcus aureus* es una especie no frecuente en la cavidad oral. Sin embargo, algunos hallazgos sugieren que el microambiente periodontal puede establecer condiciones para la colonización de una bacteria que no pertenece a la microbiota oral en la cavidad oral humana. De hecho, especies como *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* se encontraron en muestras de biofilm subgingival humano [181]. Por otro lado, el *Streptococcus mutans* es un microorganismo anaerobio facultativo, que es parte del microbioma oral y está fuertemente relacionado con la placa supragingival.

La composición de microbioma oral y placa dental está modulada por varios factores, como la dieta, las enfermedades subyacentes y el tabaco. Existe una gran variabilidad interindividual en los pacientes y esto conduce a la administración de antimicrobianos de amplio espectro para tratar enfermedades orales, como la periodontitis. Nosotros analizamos la actividad antimicrobiana contra dos representantes tipos de bacterias, como una ilustración del posible uso de las propiedades antimicrobianas de los hidrogeles timol-quitosano contra las bacterias que podrían estar presentes en pacientes con periodontitis.

3.4. Estudios de actividad antioxidante de los hidrogeles de quitosano

Finalmente, evaluamos la actividad antioxidante de los hidrogeles timol-quitosano. Las especies reactivas del oxígeno de los neutrófilos están destinadas a erradicar los patógenos, pero podrían causar daño irreversible en el tejido periodontal. El daño irreversible del tejido periodontal y recesión del tejido gingival, dos características principales de la enfermedad periodontal, podrían conducir a su vez a la pérdida de dientes. Para tener un amplio panorama de las capacidades antioxidantes de los hidrogeles de timol-quitosano realizamos un ensayo de DPPH y evaluamos la actividad simil superóxido dismutasa y simil peroxidasa (**Figura 30**).

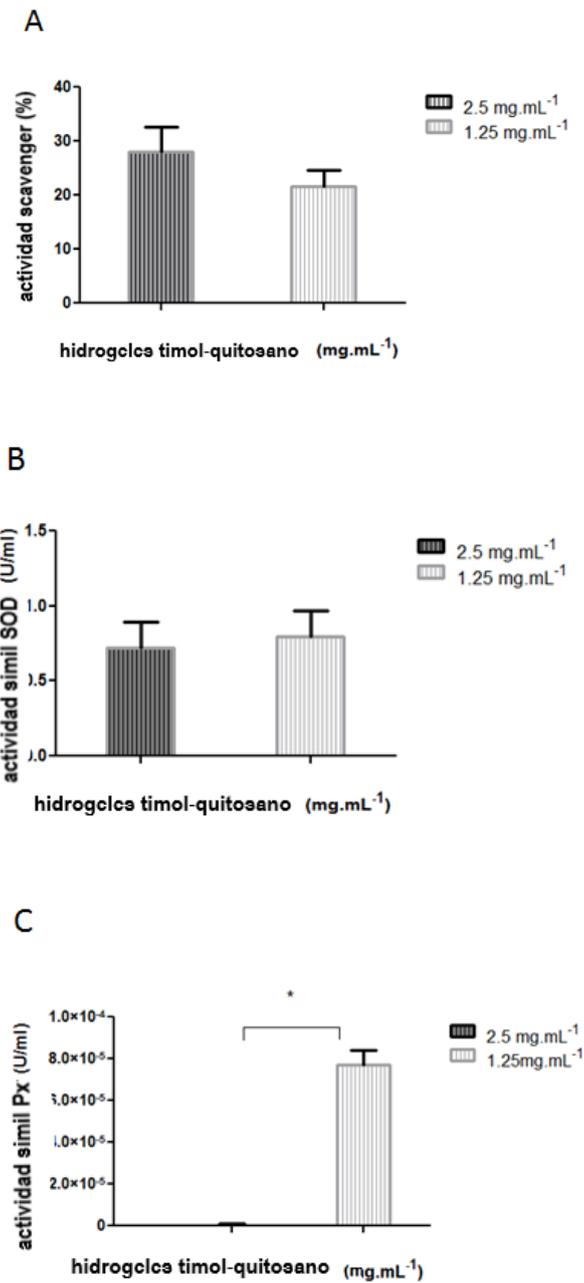


Figura 30. Actividad antioxidante de hidrogeles de timol-quitosano durante un periodo de 24hs. (A) Capacidad de eliminación de radicales libres (DPPH) (B) Actividad simil Px (C) Actividad simil SOD. Los resultados se expresan como media \pm SD de tres determinaciones realizadas por triplicado. * p < 0,05 se consideró significativo mediante la prueba t de Student

Los hidrogeles de quitosano cargados con timol mostraron una capacidad scavenger por el ensayo de DPPH después de 24 hs en la saliva artificial Fuyasama-

Meyer modificada y no se encontraron diferencias significativas en los hidrogeles cargados con $(0,99 \pm 0,03)$ mg de timol y $(0,57 \pm 0,03)$ mg de timol ($p < 0,05$).

La actividad simil superóxido dismutasa y la actividad simil peroxidasa también fueron analizadas. Los hidrogeles de timol-quitosano mostraron actividad simil superóxido dismutasa observándose que podían inhibir la oxidación de epinefrina a $pH=10,7$. Sin embargo, los hidrogeles de quitosano mostraron actividad simil peroxidasa solo cuando fueron cargados con $(0,57 \pm 0,03)$ mg de timol ($p < 0,05$). Sorprendentemente, los hidrogeles de timol-quitosano con la menor cantidad de timol presentaron actividad scavenger así como actividad simil superóxido dismutasa y simil peroxidasa.

Los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (ROS) son esenciales para muchos procesos biológicos normales, en bajas concentraciones. Sin embargo, a concentraciones más altas puede provocar una lesión de los tejidos o no ejercer un efecto antioxidante. La actividad antioxidante ejercida por la menor cantidad de timol podría proteger el hueso alveolar y el tejido conectivo de la inflamación inducida por el estrés oxidativo generado durante la periodontitis.

4. Conclusiones

La salud oral proporciona calidad de vida [182]. La mayoría de las personas tienen caries dentales y varios factores como el tabaquismo, la falta de higiene oral y la genética promueve el desarrollo de enfermedades orales que pueden terminar en pérdida de los dientes.

Los hidrogeles de quitosano ejemplifican un posible sistema de liberación para el tratamiento de la periodontitis. Por un lado, las propiedades antioxidantes del timol serían capaces de disminuir la inflamación periodontal; por otra parte, el timol podría ser un adyuvante para el control de placa dental debido a su actividad antimicrobiana. Si bien la eliminación de placa dental disminuye los signos de inflamación del paciente, es conveniente incluir el tratamiento de la inflamación para lograr una terapia gingivoperiodontal más completa.

Los hidrogeles de timol-quitosano presentaron actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* durante 72 hs. Mediante microscopia electrónica se ha demostrado la no adhesión o agregación de *Streptococcus mutans* en los hidrogeles de quitosano cargados con timol. Esto es conveniente ya que no solo es relevante desarrollar un material que libere un

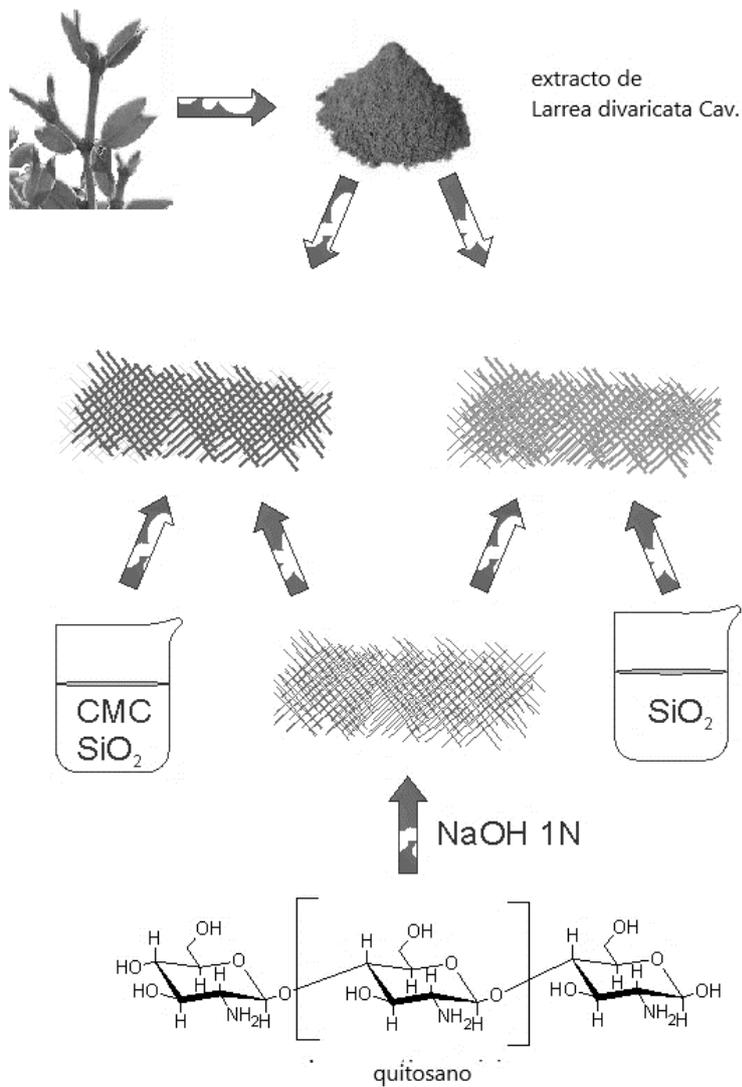
antimicrobiano, sino que también es importante evitar que dicho material sea colonizado por bacterias [183] y que sea biocompatible [184]. Aunque se observó una liberación repentina en las primeras 48 hs, los hidrogeles de quitosano pueden ser administrados fácilmente en la mucosa oral y varias aplicaciones se pueden realizar en la mucosa si es necesario. Además, mostraron una buena citocompatibilidad, lo que es particularmente importante porque la mucosa oral es sensible a sustancias irritantes.

Los hidrogeles de quitosano preparados en este capítulo fueron completamente caracterizados. Las propiedades viscoelásticas, el comportamiento de hinchamiento y el análisis térmico fueron señalados para mostrar la fuerte afinidad del quitosano por el agua, promoviendo así su mucoadhesión a la mucosa oral.

En conclusión, los resultados *in vitro* indican que los hidrogeles de timol-quitosano podrían tener dos objetivos diferentes: tratar el biofilm dental y las consecuencias de la inflamación.

CAPÍTULO 4:

DESARROLLO DE COMPÓSITOS DE BIOPOLÍMERO-SÍLICA SENSIBLES AL pH CARGADOS CON EXTRACTO DE *LARREA DIVARICATA* CAV. CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE



1. Introducción

Los materiales que responden a estímulos tienen una importancia emergente en la nanotecnología y la medicina [185,186]. La temperatura, el pH y la fuerza iónica son algunas de las variables a las cuales los materiales pueden responder de manera diferente y, por lo tanto, pueden modular su comportamiento. De hecho, los estímulos externos pueden modificar las propiedades, la estructura, las interacciones y las dimensiones del material.

Los materiales pH-responsivos son un grupo de materiales en los que la estructura y las propiedades del material cambian según el pH. La presencia de grupos ácidos y básicos en este tipo de materiales puede influir en el grado de hinchamiento y en la liberación de fármacos [187]. En el área de liberación de fármacos, se pueden utilizar materiales estímulo responsivos para lograr una liberación controlada [188]. La respuesta al pH tiene un interés especial debido al hecho de que el pH en el cuerpo humano varía entre muchos tejidos diana y en algunas afecciones patológicas como la enfermedad periodontal [189], el cáncer [190,191] y las infecciones [192].

Hoy en día, es importante desarrollar un nuevo sistema de administración que no solo desempeñe su función como carrier, sino que también tenga otras funciones, como la regeneración de los tejidos [193–195]. En este sentido, la sílica ha ganado gran interés en los últimos años [73,196].

La sílica es un material cerámico bioactivo que puede promover la formación de hueso [74]. El SiO_2 es un promotor de diferenciación documentado y su incorporación a los sistemas de liberación mejora la adhesión, diferenciación, proliferación y mineralización de osteoblastos [170]. Los grupos silanoles de la sílica son capaces de proporcionar un entorno adecuado para la biomineralización. De hecho, la sobresaturación de Ca^{++} cerca de una superficie negativa podría desencadenar la nucleación de hidroxiapatita [197].

La enfermedad periodontal es causada por bacterias periodontopatógenas [198] que desencadenan una respuesta inflamatoria que conduce a la destrucción del tejido periodontal. Inicialmente, se origina una gingivitis, la etapa inicial de la enfermedad periodontal, que consiste en la inflamación de la encía. Más tarde, aparece el estadio crónico, donde no solo está presente la inflamación, sino también la destrucción del ligamento periodontal y del hueso alveolar [199]. En este

contexto, la sílica puede desempeñar un papel clave en la regeneración periodontal ósea.

Además, los biopolímeros mucoadhesivos [200] como el quitosano (Chi) [201] y la carboximetilcelulosa (CMC) se consideran buenos candidatos para la administración local [202]. El quitosano es un polisacárido marino ya presentado y descrito en capítulos anteriores, compuesto por glucosamina y N-acetil-glucosamina y la carboximetilcelulosa es un biopolímero modificado químicamente, derivado de la celulosa. Por su parte, la CMC es un polímero aniónico con excelentes propiedades mucoadhesivas debido a la formación de puentes de hidrógeno con la capa de mucina. Mientras que el Chi es un biopolímero catiónico que puede unirse al epitelio de la mucosa a través de enlaces iónicos entre sus grupos amino y los residuos de ácido siálico [203]. Aunque ambos biopolímeros tienen diferentes estructuras y propiedades ambos presentan un perfil mucoadhesivo adecuado para la administración de fármacos.

La enfermedad periodontal se puede tratar localmente con antioxidantes, antimicrobianos y antiinflamatorios. En este sentido, productos naturales como los extractos obtenidos de una planta sudamericana llamada *Larrea divaricata* Cav. surgieron como buenos candidatos principalmente debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias [204–207]. Su extracto acuoso tiene aplicaciones prometedoras para la terapia de enfermedades gingivoperiodontales que presentan una inflamación marcada y daño tisular periodontal. Una característica interesante de los extractos de plantas es que su efecto terapéutico puede ser causado por: i) un único ingrediente activo, ii) un grupo fitoquímico particular o iii) la acción sinérgica entre varios compuestos. Particularmente, uno de los principales compuestos presentes en las hojas de *Larrea divaricata* Cav. es el ácido nordihidroguayarético (NDGA). Evidentemente, el uso de antioxidantes como *Larrea divaricata* Cav. podría tratar los efectos dañinos de la inflamación crónica, mejorando los signos y síntomas de pacientes con enfermedades gingivoperiodontales.

En este capítulo, se presentan materiales compósitos sensibles al pH constituidos por nanopartículas de sílica, Chi y CMC cargadas con extracto de *Larrea divaricata* Cav. acuoso. Los compósitos podrían tener un perfil mucoadhesivo diferencial a lo largo de la enfermedad periodontal, lo que puede ser conveniente ya que se sabe

que la saliva de pacientes con gingivitis presenta un pH más alto que la saliva de pacientes con periodontitis. Además, por HPLC se analizó la incorporación del extracto vegetal en los dos tipos de compósitos, así como el perfil de liberación del compósito que mostró la mayor incorporación, resaltando sus potencialidades. Finalmente, el estudio de citotoxicidad con fibroblastos y el análisis de biomineralización *in vitro* confirman aún más la potencial aplicación de estos compósitos en la regeneración ósea alveolar.

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

El quitosano de baja viscosidad obtenido de cangrejo, de viscosidad estructural 66 mPas y desacetilación >75,0%, la lisozima de huevo de gallina blanco 100.000 U/mg), el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, el DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y la epinefrina se compraron de Sigma-Aldrich (St Louis, EE. UU.). La carboximetilcelulosa sódica de viscosidad media con un grado de sustitución de 0,65-0,90 se obtuvo de Noviant, Holanda. La sílica coloidal (aerosil 200) con un contenido de SiO₂> 99,8% y una superficie específica de 200 m²g⁻¹ fue proporcionada por Evonik Resource Efficiency GmbH, Alemania. El medio de Eagle modificado por Dulbecco, suero fetal bovino, penicilina y estreptomycin se adquirieron en Gibco. Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

2.2. Material vegetal y extracto

Las hojas de *Larrea divaricata* Cav. fueron recolectadas en la provincia de Córdoba, Argentina e identificadas mediante análisis morfológicos, anatómicos e histoquímicos. Se depositó un espécimen de comprobante en el Museo de Farmacobotánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. El extracto acuoso de las hojas se preparó de la siguiente manera: las hojas secadas al aire se extrajeron durante 10 minutos con agua destilada hirviendo, luego el extracto se filtró y se liofilizó. El extracto acuoso se dividió en alícuotas y se almacenó a -20°C hasta su uso.

2.3. Síntesis de compósitos

Se preparó una solución de 20 mg.mL⁻¹ de quitosano en ácido acético al 1%. Posteriormente, se colocó 1 mL de quitosano en cada pocillo de una placa de 24 pocillos y se neutralizó con una solución de NaOH 1 N. Los hidrogeles obtenidos se lavaron con H₂O_d hasta que se alcanzó un pH neutro. Más tarde, los hidrogeles se incubaron durante 24 hs con 1 mL de dos dispersiones de etanol y agua (10:90): el primero constituido por 350 mg.mL⁻¹ de glicerol y 14 mg.mL⁻¹ de SiO₂ mientras que el segundo contenía 350 mg.mL⁻¹ de glicerol, 14 mg.mL⁻¹ de SiO₂ y 15 mg.mL⁻¹ de CMC. Para los compósitos cargados con extracto de *Larrea divaricata* Cav., el extracto liofilizado de la planta se añadió en una concentración de 6,6 mg.mL⁻¹ a las dos dispersiones de etanol-agua descritas anteriormente. Posteriormente, los compósitos se lavaron con agua desionizada.

2.4. Caracterización ultraestructural

Los hidrogeles de quitosano y los compósitos se analizaron por microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras se fijaron con una solución de glutaraldehído (10% v/v) durante 1 hora a 4°C. Después de la fijación, las muestras se lavaron tres veces con agua desionizada y se congelaron a -80°C. Finalmente, las muestras se liofilizaron y se recubrieron con oro para su análisis con un microscopio Zeiss SUPRA 40.

2.5. Caracterización por FT-IR

Los espectros infrarrojos (FTIR) de los materiales liofilizados se realizaron con un equipo de FTIR-Raman Thermo Scientific Nicolet modelo IS, que está acoplado con un dispositivo de reflexión total atenuado (ATR). El rango de escaneo fue 4000-500 cm⁻¹. Los espectros fueron procesados por el software Thermo Nicolet OMNIC.

2.6. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se llevaron a cabo mediciones de calorimetría diferencial de barrido (DSC) en un instrumento Shimadzu DSC-50. La temperatura se calibró con In (157 °C, 3,3 J mol⁻¹). Aproximadamente 20 mg de los compósitos o hidrogeles de quitosano secados por liofilización se equilibraron primero a 25°C y luego se calentaron de 25 a 240

°C a una velocidad constante de 10 °C.min⁻¹, bajo un flujo de nitrógeno de 50 mL.min⁻¹

2.7. Mediciones reológicas

Primero se realizaron barridos de amplitud para determinar el rango viscoelástico lineal (LVR). Luego, mediante ensayos de corte dinámico se obtuvieron el módulo elástico o de almacenamiento, G', el módulo viscoso o de pérdida, G'' y la viscosidad compleja (η^*) en función de la frecuencia (ω), en un rango de 0,1 a 500 s⁻¹ de los materiales estudiados usando un reómetro rotacional de Anton Paar (MCR-301) provisto con una cámara termostazada CTD 600. Las pruebas se realizaron usando placas paralelas de 25 mm de diámetro, una tensión de $\gamma = 1,0\%$. Las mediciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente (20°C) y todas las pruebas se realizaron utilizando deformaciones pequeñas para garantizar la linealidad de las respuestas dinámicas. Todas las medidas se repitieron usando diferentes muestras. El ancho de espacio utilizado fue de 1,8-2 mm.

2.8. Estudios de hinchamiento

Los compósitos e hidrogeles de quitosano se liofilizaron, se pesaron (W_0) y se almacenaron en buffer a pH 6,5 o 7,5 para permitir la absorción de agua. Se pesaron los hidrogeles o compósitos (W) en diferentes tiempos (t) después de eliminar el exceso de buffer pH 6,5 o 7,5. El grado de hinchamiento se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$W\% = [(W - W_0) / W_0] \times 100$$

Posteriormente, el contenido de agua en equilibrio (W_∞) y las constantes de velocidad cinética se calcularon de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$t/W = 1 / (KW^2_\infty) + t/W_\infty$$

donde t es el tiempo

2.9. Biodegradabilidad de los compósitos

Los hidrogeles de quitosano y los compósitos se liofilizaron y pesaron (W_0). Posteriormente, se sumergieron en PBS (pH 7,4) con 1 mg.mL⁻¹ de lisozima (100.000 U.mg⁻¹) a 37°C. Después de 7 días, los hidrogeles y compósitos se lavaron, se liofilizaron y se pesaron ($W_{7 \text{ días}}$). Se evaluó el porcentaje de peso para

evaluar la biodegradación de hidrogeles de quitosano y compósitos según la siguiente ecuación:

$$W\% = (W_{7\text{días}} / W_0) \times 100$$

2.10. Incorporación y liberación de *Larrea divaricata* Cav.

Se analizó la incorporación del extracto acuoso de *Larrea divaricata* Cav. en los compósitos de polímero mucoadhesivo con nanopartículas de sílica mediante una técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). El análisis por HPLC se realizó con un instrumento Varian Pro Star equipado con una válvula de inyección Rheodyne de 20 μL y un detector de arreglo de diodos ajustado a 280 nm. Se usó una columna de fase inversa C18 Shodex 150 x 4,6 mm (5 $\mu\text{ dp}$). Como fase móvil, se empleó un sistema de gradiente. El sistema estaba compuesto por un solvente A, agua y ácido acético (98:2) y por un solvente B, metanol y ácido acético (98: 2) de acuerdo con el gradiente: 30% de B a 100% de B en 30 min. El procedimiento cromatográfico se llevó a cabo a temperatura ambiente con un flujo de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Para el estudio de liberación del extracto de *Larrea divaricata* Cav. desde los compósitos se realizó la adición de 1 mL de buffer fosfato pH 6,5 en cada compósito. El medio de liberación se eliminó en diferentes tiempos de los compósitos y se repuso con medio nuevo. El método empleado para evaluar la concentración del extracto de la planta en las soluciones fue la técnica de HPLC descrita anteriormente.

2.11. Actividad antioxidante

2.11.1. Ensayo DPPH

La capacidad eliminadora de radicales libres se evaluó mediante el método de Blois modificado en el que se monitorea la velocidad de blanqueo del DPPH a una longitud de onda característica en presencia de la muestra [171]. El ensayo se realizó de la siguiente manera: 100 μL de extracto de *Larrea divaricata* Cav. extraído de los compósitos de biopolímero-sílica se mezclaron con 400 μl de buffer Tris pH =7,4 y 500 μl de DPPH 100 μM . La absorbancia se midió a 517 nm. La inhibición de DPPH se calculó mediante la ecuación:

$$\% \text{inhibición} = [1 - (A_{\text{muestra}} / A_{\text{DPPHcontrol}})] \times 100$$

donde A es la absorbancia medida.

2.11.2. Actividad de simil superóxido dismutasa

La actividad simil superóxido dismutasa se determinó por la capacidad de inhibir la autooxidación de epinefrina, a adrenocromo, en presencia de oxígeno en la atmósfera [173]. Para este propósito, 50 μL de extracto de *Larrea divaricata* Cav. extraído de los materiales compósitos, se mezclaron con 910 μL de buffer fosfato pH 10,7 y 40 μL de epinefrina 2 mM. La absorbancia resultante se midió a 480 nm cada 10 segundos durante 5 min y se calculó la Δ absorbancia/min. La actividad antioxidante de las muestras se evaluó como el % de inhibición de la autooxidación de la epinefrina mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = [(\Delta\text{Abs}/\text{min}_{\text{epinefrina}} - \Delta\text{Abs}/\text{min}_{\text{muestra}}) / \Delta\text{Abs}/\text{min}_{\text{epinefrina}}] \times 100$$

2.12. Bioactividad *in vitro*

Se realizaron estudios preliminares de bioactividad *in vitro* en los compósitos de biopolímero-sílica. En este sentido, evaluamos la formación de hidroxiapatita en la superficie de los compósitos en fluido corporal simulado (SBF) que tiene casi la misma concentración de iones que el plasma (Na^+ 142 mM; K^+ 5,0 mM; Mg^{2+} 1,5 mM; Ca^{2+} 2,5 mM; Cl^- 147,8 mM; HCO_3^- 4,2 mM; HPO_4^{2-} 1,0 mM; SO_4^{2-} 0,5 mM, pH 7,40). Se preparó el SBF como se detalla en Kokubo *et al.* [208]. Después de incubar los materiales compósitos en SBF durante 3, 7 y 14 días, se lavaron, se fijaron en una solución de glutaraldehído (10% v/v) durante 1 hora a 4°C y se analizaron mediante SEM-EDS (Microscopia Electrónica de Barrido con detector EDS)

2.13. Citotoxicidad

Se cultivaron fibroblastos [3T3] de ratón para la prueba de citotoxicidad en botellas de cultivo adherentes con medio de Eagle modificado de Dulbecco de baja glucosa (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor y 1% de penicilina-estreptomina. Las células se mantuvieron a 37°C en una cámara humidificada al 5% de dióxido de carbono hasta que se alcanzó la confluencia. La disrupción y remoción celular se hizo con una solución de tripsina-EDTA. Las células se tiñeron con azul tripán y se contaron con una cámara Neubauer. Se sembraron células de fibroblastos ($4,0 \times 10^4$) en cada pocillo seguido de la adición de 1 mL de medio DMEM completo de baja glucosa. Después de 48 hs de incubación, se

añadieron ambos tipos de materiales compósitos a la placa de 24 pocillos en la parte superior de la capa de fibroblastos y se midió la actividad metabólica celular a las 24 hs usando el ensayo de MTT. Primero, el medio se retiró y se reemplazó por 1 mL de una solución de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT disuelto en medio. Las muestras se incubaron en una cámara humidificada al 5% de dióxido de carbono durante 4 hs. Posteriormente, se eliminaron las soluciones de MTT, se añadió 1 mL de etanol absoluto y las mezclas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se registró a 570 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Cecil CE 3021, Cambridge, Inglaterra).

2.14. El análisis estadístico

Los datos se representan como medias \pm desviación estándar de al menos triplicados. Las diferencias se analizaron mediante ANOVA (análisis de la varianza), seguido de una prueba de comparación múltiple de Bonferroni. En otros casos se realizó una prueba t de Student. La evaluación estadística $p < 0,05$ o $p < 0,01$ se consideró significativa.

3. Resultados y discusión

3.1. Síntesis y caracterización de compósitos

La estructura de los hidrogeles fue analizada por SEM. Las imágenes SEM mostraron que los compósitos de a) compósito chi-SiO_2 b) compósito chi-CMC-SiO_2 y c) hidrogel de quitosano tienen una estructura porosa y uniforme indicando que la adición de nanopartículas de sílica al quitosano no modifica al hidrogel (**Figura 31A-C**). Además, las nanopartículas de sílica de un tamaño de 10 nm eran claramente visibles (**Figura 31D**).

El análisis FTIR revela las señales de posibles estiramientos y deformaciones vibratorias dentro de los compósitos. La asignación de estas vibraciones a grupos funcionales específicos permite la identificación de grupos químicos de la muestra, lo que proporciona una mejor comprensión de estos nuevos materiales. (**Figura 31E**). El espectro muestra una banda a $1660\text{-}1620 \text{ cm}^{-1}$ que corresponde a la banda de amida I. Esta banda está compuesta por dos amplios picos a 1655 cm^{-1} y 1625 cm^{-1} (estiramiento C=O y C-N, respectivamente). La banda de amida II (1540 cm^{-1} , estiramiento N-H) es indetectable junto con la banda de amida III (1390 cm^{-1}). Además, como se esperaba, se detectaron bandas de óxido de silicio en los

compósitos. De hecho, las bandas a 500 cm^{-1} (O-Si-O) y en 1050 cm^{-1} (Si-O) en ambos compósitos, Chi-CMC-SiO₂ y Chi-SiO₂, indican la presencia de sílice coloidal (Figura 31E-G).

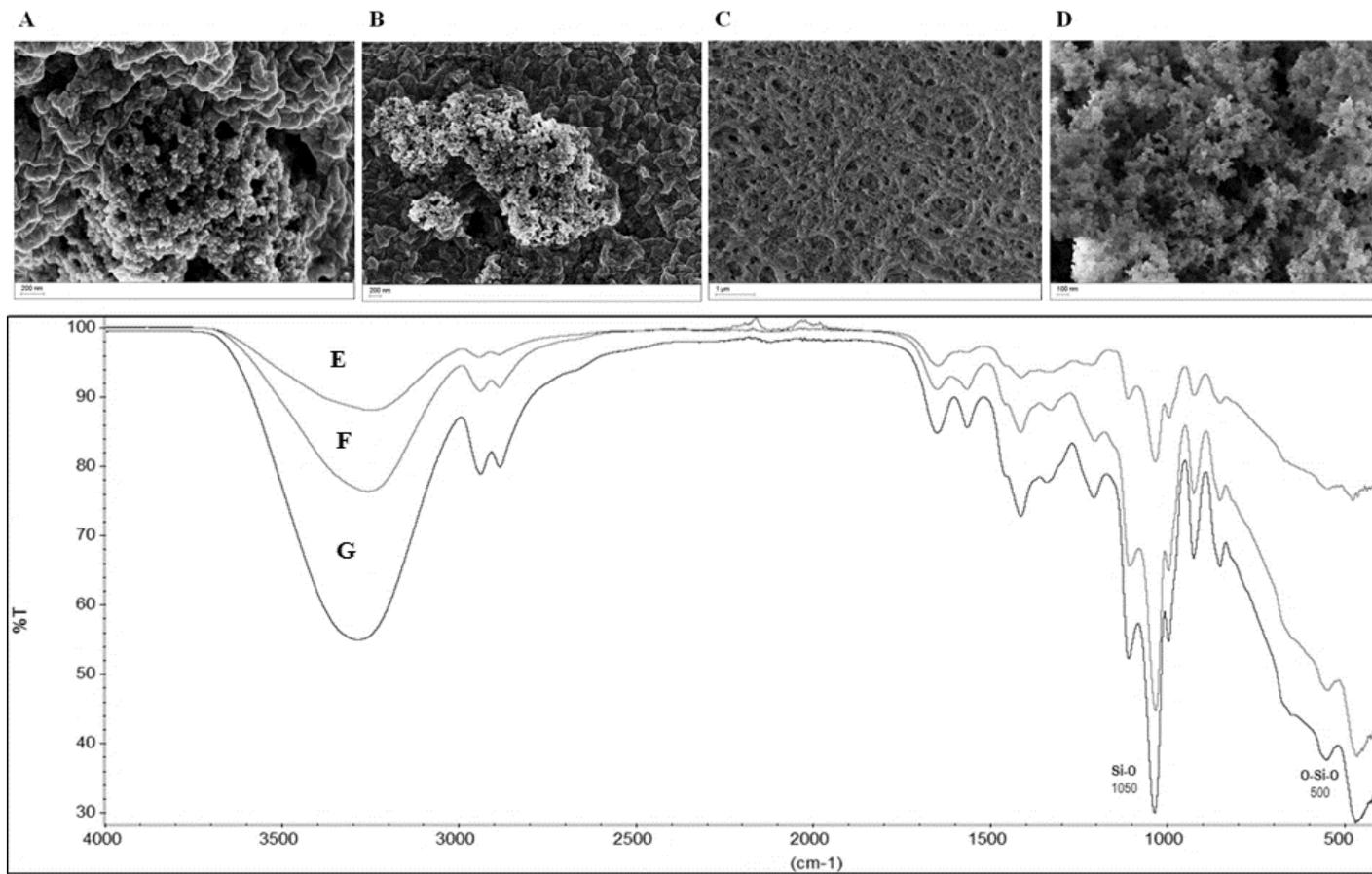


Figura 31. Imágenes representativas de microscopía electrónica de barrido de (A) compuesto chi-SiO₂ (B) compuesto chi-CMC-SiO₂ (C) hidrogel de quitosano (D) nanopartículas de SiO₂. Espectros infrarrojos con transformada de Fourier de (E) chi-CMC (F) chi-CMC-SiO₂ (G) chi-SiO₂

Además, se llevó a cabo un análisis térmico de los compósitos (**Figura 32A**). Al analizar los termogramas obtenidos por la técnica de DSC, hubo diferencias en el área y la posición del pico endotérmico causado por la pérdida de agua. Estos hallazgos indican que los compósitos difieren en la interacción agua-compósito y, por lo tanto, en su capacidad de retención de agua. En el caso de chi-SiO₂, se observó un desplazamiento de 40°C mediante la adición de glicerol y nanopartículas de sílica. Por otro lado, en el caso de chi-CMC-SiO₂, donde se agregó el polisacárido carboximetilcelulosa al material compósito, el cambio fue incluso mayor (60°C). Claramente, la adición de nanopartículas hidrofílicas, glicerol y carboximetilcelulosa sódica aumenta la capacidad de retención de agua del quitosano.

En general, la magnitud de los valores G' y G'' frente a la frecuencia (dentro de un rango de frecuencia) y la relación de G' a G'' se pueden usar para estimar la resistencia de los hidrogeles. En principio, los hidrogeles reológicamente resistentes están asociados con valores más altos de G', y a su vez estos valores de G' deben ser uno o dos órdenes mayores que G''. Puede decirse entonces que los compósitos chi-CMC-SiO₂ son predominantemente elásticos, porque los valores del módulo de almacenamiento (*c.a.* 1000 Pa) fueron mayores siempre que los valores del módulo de pérdida (*c.a.* 100 Pa) G con un probable buen perfil de hinchamiento, pero no tan resistentes como los hidrogeles de quitosano (**Figura 32B, C**).

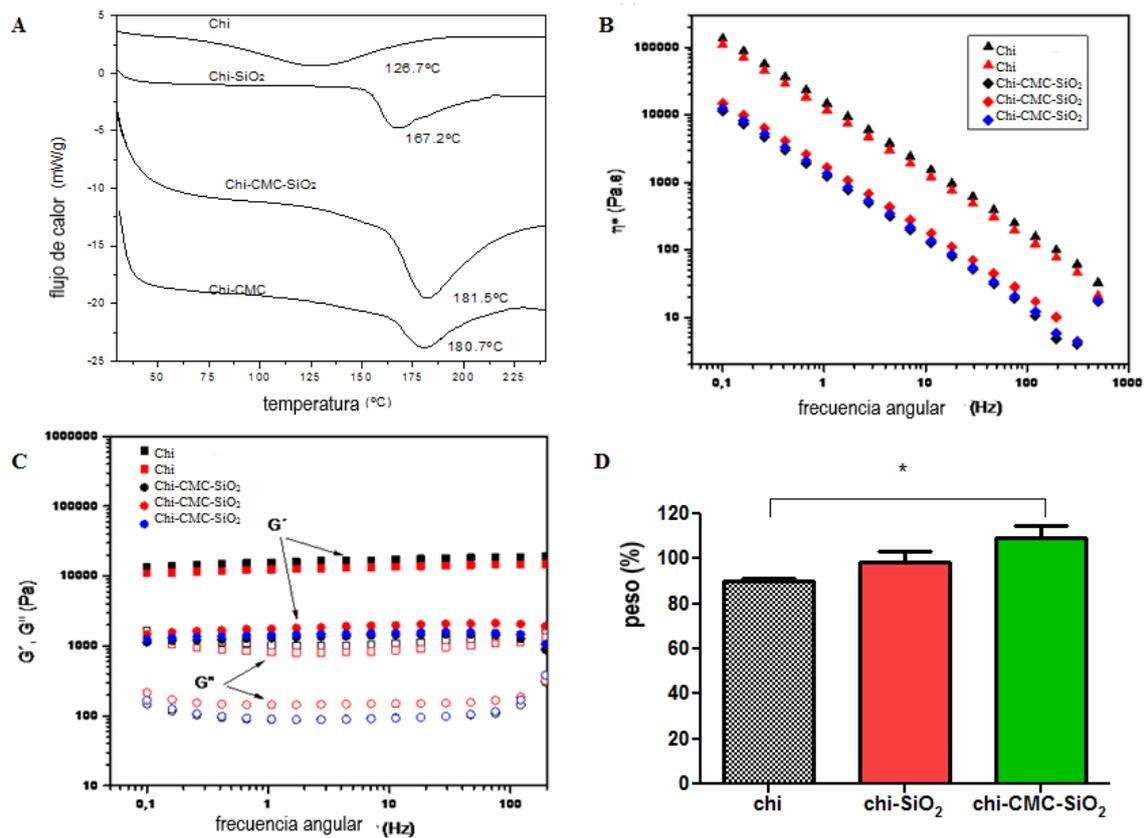


Figura 32. (A) Termogramas DSC de los materiales a una velocidad de calentamiento de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ bajo un flujo de nitrógeno de $50 \text{ ml}.\text{min}^{-1}$ (Chi) quitosano (Chi-SiO₂) quitosano-SiO₂ (Chi-CMC-SiO₂) quitosano-CMC-SiO₂ (Chi-CMC) quitosano-CMC. (B) Viscosidad compleja del hidrogel de quitosano y compuesto quitosano-CMC-SiO₂ frente a la frecuencia (C) Respuesta viscoelástica del hidrogel de quitosano y el compuesto quitosano-CMC-SiO₂ frente a la frecuencia (G' y G''). (D) Biodegradación de hidrogeles de quitosano y compósitos Chi-SiO₂; Chi-CMC-SiO₂ en un período de 7 días con $1 \text{ mg}.\text{mL}^{-1}$ de lisozima en PBS.

En paralelo, se realizó una prueba de biodegradabilidad a los compósitos. La saliva es un fluido natural que contiene electrolitos y enzimas como la lisozima [209], que es capaz de degradar el quitosano porque puede hidrolizar enlaces β -1,4 entre los monómeros ácido N-acetilmurámico y N-acetil-d-glucosamina. Los hidrogeles y compósitos de quitosano fueron expuestos a la lisozima para evaluar su biodegradación. Los compósitos chi-CMC-SiO₂ no mostraron degradación, pero los compósitos chi-SiO₂ y los hidrogeles de quitosano presentaron *c.a.* 10% de biodegradación ($p < 0,05$) (Figura 32D). Evidentemente, la biodegradabilidad se modificó mediante la adición de CMC que probablemente influye en la capacidad de degradación hidrolítica de la lisozima.

Paralelamente, realizamos el perfil de hinchamiento de los compósitos e hidrogeles de quitosano a dos pH diferentes (Figura 33A, B).

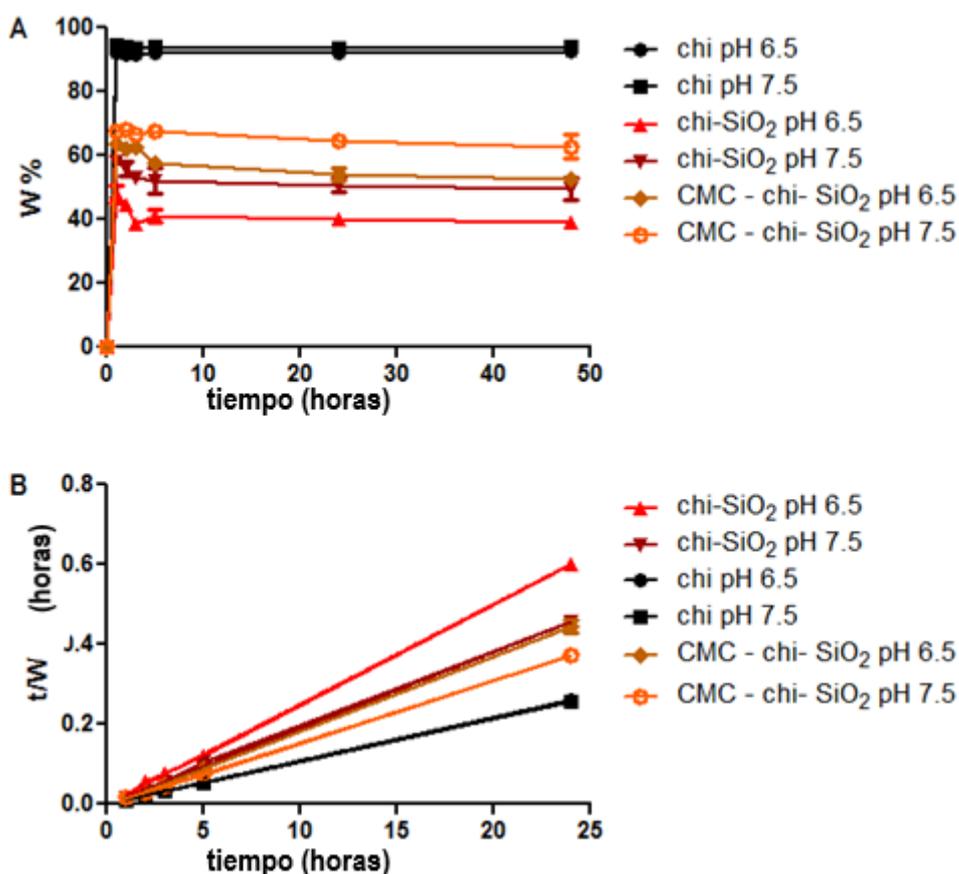


Figura 33. (A) Perfil de hinchamiento de quitosano (chi); compósito de quitosano-SiO₂ (chi-SiO₂); compósito quitosano-carboximetilcelulosa-SiO₂ (chi-CMC-SiO₂) a pH 6,5 y 7,5 (B) Datos experimentales del contenido de agua y tiempo según una cinética de segundo orden de los compósitos biopolímero-silica e hidrogeles de quitosano,

El perfil de hinchamiento evalúa la afinidad por el agua del material y, por lo tanto, estima sus propiedades de mucoadhesividad. A pesar de que en todos los casos el perfil de hinchamiento siguió una cinética de segundo orden y alcanzó el equilibrio en casi una hora, los dos tipos de compósitos presentaron un comportamiento de hinchamiento diferente debido al pH. El quitosano probablemente esté ionizado a pH 6,5, lo que fomenta la formación de pares iónicos con grupos ácidos carboxílicos y grupos silanoles que podrían modificar la afinidad de los compósitos por el agua. En el caso de los hidrogeles de quitosano, a pesar de que la afinidad por el agua fue mayor, no se observó influencia del pH. En el caso de ambos compósitos, se absorbió una mayor cantidad de agua a pH 7,5. El contenido de agua en equilibrio

(W_{∞}) calculado para los compósitos y los hidrogeles de quitosano se detalla en la **Tabla 2**. Los hidrogeles de quitosano presentaron *c.a.* 93% del contenido de agua mientras que el contenido de agua en equilibrio de los compuestos Chi-CMC-SiO₂ y Chi-SiO₂, a un pH de 7,5 fueron de *c.a.* 64% y *c.a.* 52% respectivamente. Estos resultados fueron casi 10% más altos que los observados a pH 6,5 para los mismos compósitos.

Tabla 2. Contenido de agua en el equilibrio (W_{∞}) de los hidrogeles de quitosano y compósitos Chi-SiO₂; CMC-chi-SiO₂ y coeficiente de determinación (r^2) del contenido de agua de acuerdo con una cinética de segundo orden

	W_{∞}	r^2
chi-SiO ₂ pH 6.5	39,91	0,9985
chi-SiO ₂ pH 7.5	52,63	0,9963
chi pH 6.5	92,04	1,0000
chi pH 7.5	93,52	0,9999
CMC - chi- SiO ₂ pH 6.5	53,39	0,9975
CMC - chi- SiO ₂ pH 7.5	64,26	0,9996

Evaluamos también la incorporación del extracto acuoso de *Larrea divaricata* Cav. en los compósitos por un método de HPLC, así como los perfiles por HPLC del extracto. Estudios previos de infusiones de *L. divaricata* Cav. analizadas por HPLC mostraron compuestos tales como el ácido cinámico y nor-dihidroguayarático [210]. Se demostró que ambos compósitos podrían incorporar muchos activos presentes en el extracto acuoso y que la mayoría de ellos son compuestos polares. Esto es consistente con el hecho de que los compósitos mostraron ser altamente hidrofílicos y, por lo tanto, los compuestos polares serían mucho más fáciles de incorporar. Por este motivo, el biomarcador ácido nor-dihidroguayarático (NDGA), uno de los principales compuestos del extracto *Larrea divaricata* Cav., no estaba presente en los cromatogramas obtenidos (**Figura 34A-D**).

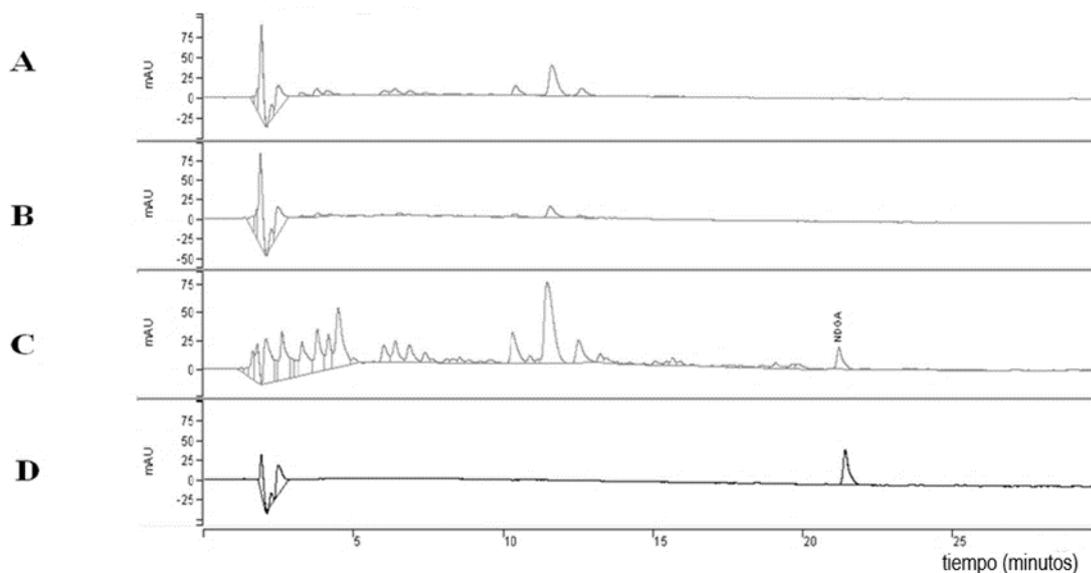


Figura 34. Cromatogramas de HPLC. Extracto incorporado a los compósitos (A) Chi-CMC-SiO₂ (B) Chi-SiO₂ (C) control extracto (D) control NDGA. Los cromatogramas son representativos de tres determinaciones.

Según los resultados obtenidos por HPLC, los compuestos más polares que el NDGA contribuirían a la actividad antioxidante observada en los compósitos. Estos hallazgos respaldan que las propiedades antioxidantes del extracto de *Larrea divaricata* Cav. no solo se atribuyen al biomarcador NDGA.

En cuanto al análisis cuantitativo, los compósitos Chi-CMC-SiO₂ mostraron una mayor incorporación del extracto en comparación a los compósitos Chi-SiO₂. El grado de incorporación del extracto para el compósito Chi-CMC-SiO₂ fue de 44,36% CV: 3% mientras que para el compósito fue de Chi-SiO₂ 18,32% CV: 11%. Estos porcentajes expresan la cantidad de extracto incorporado con respecto a la cantidad de extracto incubado con los compósitos después de 24 hs. La incorporación del extracto acuoso de *Larrea divaricata* Cav. por los compósitos de Chi-CMC-SiO₂ es casi dos veces mayor en comparación a los compósitos de Chi-SiO₂ indicando que la adición de CMC aumentó la incorporación del extracto a los compósitos. Debido a las diferencias observadas en ambos compósitos, se decidió realizar el estudio de liberación del extracto solo a partir de los compósitos Chi-CMC-SiO₂. Considerando que la saliva normal es un fluido natural con un rango de pH entre 6,5 y 7, decidimos llevar a cabo el perfil de liberación en buffer de fosfato de pH 6,5 que es el pH más

bajo encontrado en la literatura para pacientes que sufren periodontitis. El extracto de *Larrea divaricata* Cav. presente en el compósito alcanzó la liberación del 100% en casi 4 días (**Figura. 35A**). Dentro de las primeras cinco horas, casi el 80% del extracto fue liberado. Luego, el patrón de liberación cambió, y la cantidad de extracto remanente en el compósito se liberó gradualmente hasta el cuarto día. El perfil HPLC del extracto de *Larrea divaricata* Cav. liberado del compósito Chi-CMC-SiO₂ se conservó a lo largo del estudio de liberación como se muestra en la **Figura 35B-F**.

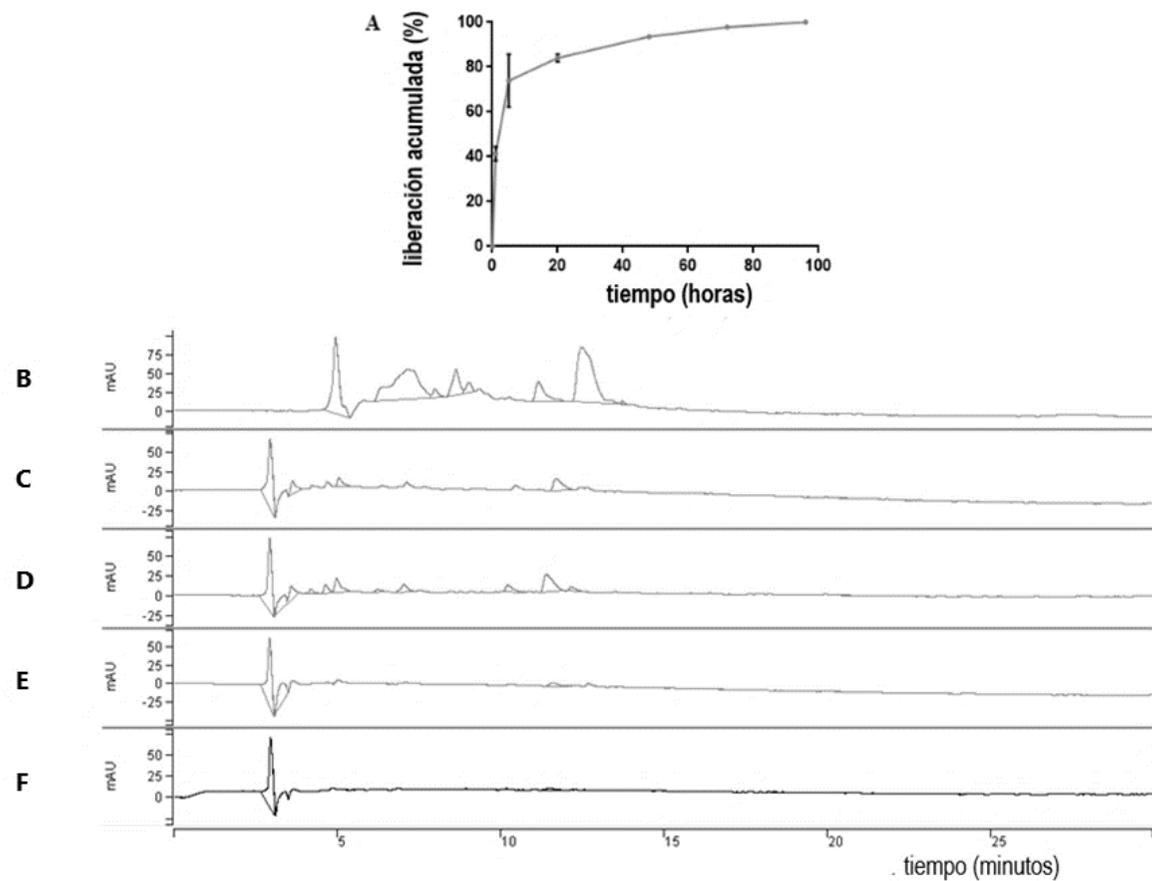


Figura 35. (A) Liberación acumulada en buffer pH 6,5 de extracto *L. divaricata* Cav. por HPLC desde el compuesto carboximetilcelulosa-quitosano-SiO₂ (CMC-chi-SiO₂) Cromatogramas de HPLC representativos del extracto *L. divaricata* Cav. liberado de compuesto chi-CMC-SiO₂ en buffer pH 6,5 (B) extracto total incorporado (C) 1 h (D) 5 hs (E) 48 hs (F) 72 hs

3.2. Estudio de la actividad antioxidante de los compósitos

La enfermedad periodontal se inicia por la presencia de una biopelícula subgingival y es modulada por la respuesta inflamatoria e inmune. Muchos estudios sostienen que el equilibrio dinámico entre las especies reactivas de oxígeno y antioxidantes podría jugar un papel importante en la patogenia de la enfermedad periodontal [211]. De hecho, estudios de biopsias gingivales *in vitro* revelaron una actividad disminuida de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), alentando la hipótesis de que estas enzimas evitan la producción excesiva de ROS y, por lo tanto, la curación periodontal [212].

Los antioxidantes representan la primera línea de defensa contra el daño por radicales libres. Se pueden clasificar de acuerdo con su modo de acción: antioxidantes preventivos, como enzimas reparadoras de SOD, CAT y ADN que modulan los procesos redox y compuestos scavengers tales como los carotenoides y los polifenoles que son antioxidantes “rompedores de cadena”. Además, los antioxidantes pueden tener efectos positivos en la regulación, la migración de los fibroblastos y la proliferación a lo largo de los procesos de curación gingival y reparación periodontal [213]. De hecho, pueden reducir la producción de citocinas y proteínas proinflamatorias, neutralizar las especies reactivas de oxígeno y promover el proceso de curación de heridas [214].

Debido a la relación entre ROS y la enfermedad periodontal, la suplementación adyuvante antioxidante podría ayudar a tratar los signos y síntomas de la enfermedad periodontal [215]. En este sentido, varios extractos de plantas han demostrado ser útiles para tratar la inflamación de la cavidad oral [6,216,217]. Por lo tanto, un estudio detallado de un extracto de planta candidata en un carrier adecuado para el tratamiento de la enfermedad periodontal podría tener una relevancia significativa.

Para la evaluación de la capacidad antioxidante de los compósitos cargados con *L. divaricata* Cav., se llevaron a cabo dos métodos diferentes (**Figura 36A, B**).

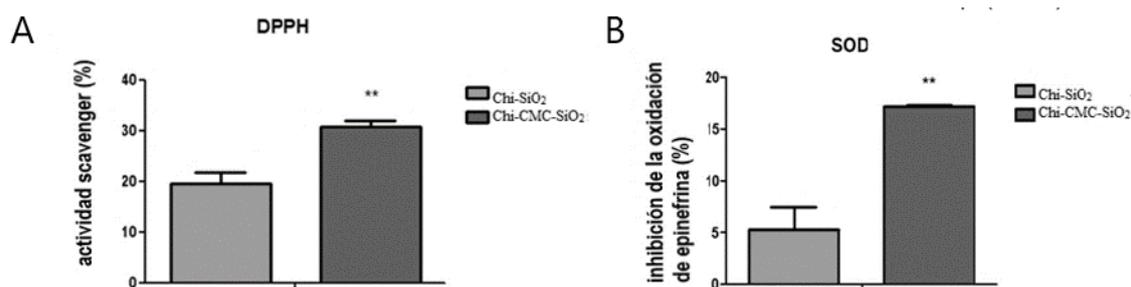


Figura 36. Actividad scavenger por DPPH (A) y actividad simil radical SOD (B) del extracto de *L. divaricata* incorporado en compósitos de Chi-SiO₂ y Chi-CMC-SiO₂. Los resultados se expresan como la media \pm SD de tres determinaciones realizadas. ** p <0,01 diferencia significativa entre Chi-SiO₂ y Chi-CMC-SiO₂ según estadística T de Student.

En primer lugar, se evaluó su capacidad para eliminar los radicales libres mediante el método de DPPH y, en segundo lugar, se evaluó su actividad simil SOD tal como se describe en la Sección 2.11.2. Se observó que los compósitos Chi-CMC-SiO₂ presentaban 3,5 veces más actividad simil SOD y una capacidad para eliminar los radicales libres por el ensayo DPPH 1,5 veces mayor en comparación con los compósitos de Chi-SiO₂. Estos resultados están en acuerdo con las diferencias observadas en la incorporación del extracto de *Larrea divaricata* Cav. en los dos tipos de compósitos.

Además, durante todo el estudio de liberación, evaluamos simultáneamente, por el método DPPH, las propiedades antioxidantes del extracto liberado del compósito Chi-CMC-SiO₂, para verificar si su actividad fue preservada. La **figura 37** muestra la actividad antioxidante asociada al extracto durante un período de 4 días, en concordancia con el estudio de liberación.

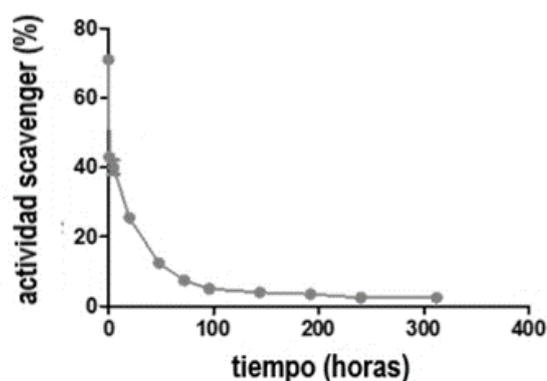


Figura 37. Actividad scavenger del extracto liberado de *L. divaricata* Cav. en buffer pH 6,5 por DPPH.

3.3. Bioactividad y estudios de citotoxicidad de los compósitos

Los compósitos han ganado mucha atención en la regeneración de hueso debido a su similitud con él [218,219]. Considerando que, en la enfermedad periodontal, particularmente en su etapa avanzada, la periodontitis, el daño tisular alcanza el hueso alveolar, pretendíamos evaluar el papel de las nanopartículas de sílica en los compósitos. Dado que el hueso está constituido por proteínas extracelulares orgánicas y material inorgánico, la microestructura de los materiales constituidos por polímero y un material cerámico puede ayudar a estimular la remodelación [220–223]. De hecho, la nucleación de hidroxiapatita está influenciada por la acumulación electrostática de cationes y debe seguir requisitos estructurales y estereoquímicos. En este sentido, las superficies negativas fomentan la formación de una superficie rica en Ca^{2+} que puede atraer HPO_4^{2-} , facilitando la formación de sitios de nucleación [224]. La incubación de los compósitos en el fluido corporal simulado durante 14 días reveló que solo el compósito Chi-SiO₂ presentaba una acumulación de calcio en su superficie (**Figura 38A, B**) mientras que en Chi-CMC-SiO₂ la adición de CMC desfavoreció la acumulación de calcio (**Figura 38C, D**).

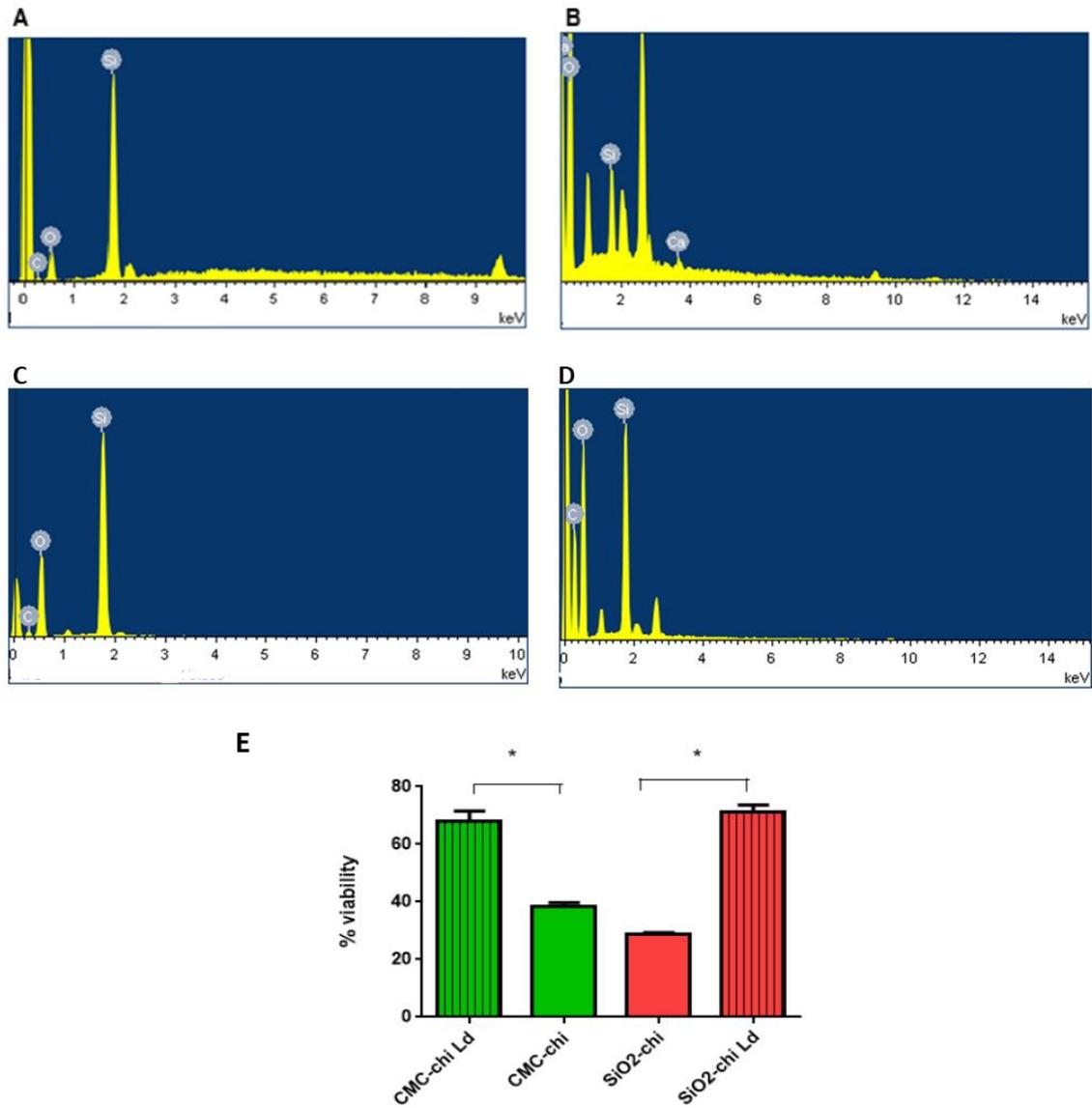


Figura 38. (A) EDS-SEM del compuesto Chi-SiO₂ día 0 en fluido corporal simulado (B) EDS-SEM del compuesto de Chi-SiO₂ día 14 en fluido corporal simulado (C) EDS-SEM del compuesto Chi-CMC-SiO₂ día 0 en fluido corporal simulado (D) EDS-SEM del compuesto de Chi-CMC-SiO₂ día 14 en fluido corporal simulado (E) citotoxicidad con fibroblastos [3T3] de ratón durante 24 hs en compósitos de Chi-SiO₂ y chi-CMC-SiO₂ mediante un ensayo colorimétrico de bromuro de tetrazolio azul de tiazolilo para evaluar la proliferación celular. Las diferencias se analizaron utilizando ANOVA de una vía, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni, $p < 0,05$ se consideró significativo.

Se realizó un estudio de citotoxicidad en los compósitos con fibroblastos por 24 hs. Para ello, decidimos realizar el estudio sobre una capa de células de fibroblastos. Se emplearon células de fibroblastos debido a su importancia en los tejidos blandos orales, ya sea como un componente celular de la mucosa oral o debido a su papel en la curación de heridas. En la enfermedad periodontal, la mucosa oral está

seriamente dañada, al punto de que la remodelación tisular se convierte en un factor crucial en términos de la conservación periodontal.

La citotoxicidad de los materiales puede ser clasificada basado en la viabilidad celular relativa a los controles, donde un nivel de actividad en comparación con los controles de <30% es una citotoxicidad grave, entre 30 y 60% es citotoxicidad moderada, entre 60 y 90% es citotoxicidad leve, y >90% no es citotoxicidad [225,226].

En consecuencia, los compósitos Chi-SiO₂ y Chi-CMC-SiO₂ evaluados presentaron un efecto citotóxico moderado y los materiales con un efecto tóxico moderado en el ensayo de MTT pueden ser considerados como materiales potenciales para aplicaciones biomédicas [227].

Sin embargo, vale la pena mencionar que cuando fueron cargados con *Larrea divaricata* Cav. su citotoxicidad se redujo porque el extracto promueve la proliferación de fibroblastos (**Figura 38E**) (p <0,05).

4. Conclusiones

Una gran variedad de polímeros constituyen biomateriales interesantes debido a su biocompatibilidad, ausencia de toxicidad y fácil procesamiento para aplicaciones biomédicas [228–230]. La comprensión de las particularidades de cada tipo de biopolímero puede ayudar a diseñar biomateriales adecuados para tratar enfermedades orales como la enfermedad periodontal. Por lo tanto, un estudio de un carrier con un bioactivo es obligatorio en términos de mucoadhesividad y liberación.

En este capítulo de tesis, dos compósitos de biopolímero-silica cargados con extracto acuoso de *L. divaricata* Cav. se presentan junto con una caracterización detallada. Interesantemente, su perfil de hinchamiento podría ser modulado por el pH de la saliva de pacientes que sufren de enfermedad periodontal. La ionización de los grupos amino del quitosano, los grupos de ácido carboxílico de la CMC y los grupos silanoles de las nanopartículas de sílica son responsables de los distintos comportamientos de hinchamiento entre pH 6,5 y 7,5. El análisis térmico también indicó diferencias en su capacidad de retención de agua y los termogramas DSC revelaron que el compósito Chi-CMC-SiO₂ presentó la máxima afinidad por el agua. Si bien ambos compósitos podrían incorporar el extracto acuoso *L. divaricata* Cav., los compósitos de Chi-CMC-SiO₂ mostraron una mayor incorporación y, por

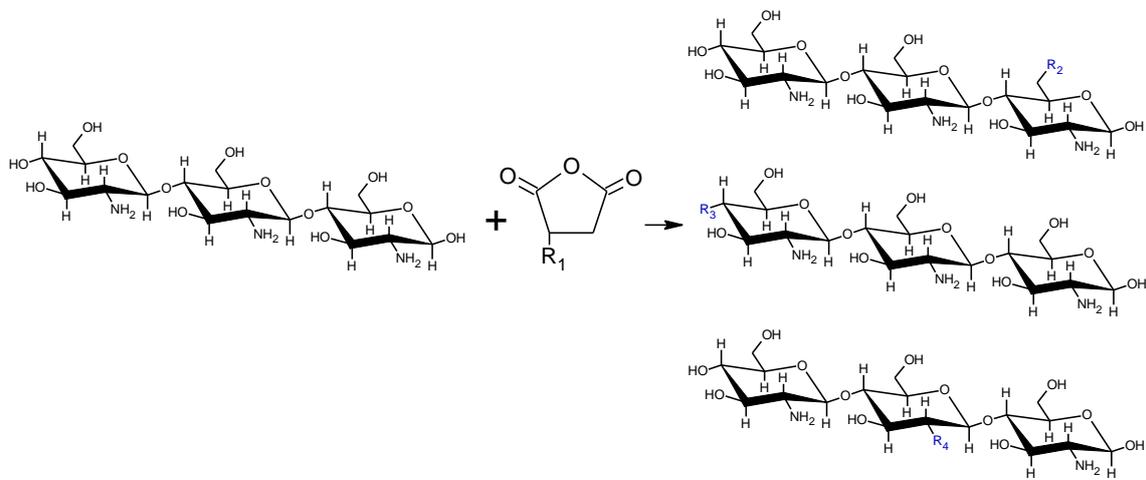
supuesto, una mayor actividad antioxidante. Los perfiles de HPLC de *L. divaricata* Cav. demostraron que varios activos pudieron incorporarse. Esto es bastante interesante, porque hay algunas discrepancias en la literatura con respecto a los efectos beneficiosos de NDGA. En este sentido, ha sido informada el efecto de toxicidad renal y hepatotoxicidad en su uso crónico [231]. En consecuencia, el desarrollo de los compósitos sin NDGA podrían evitar estos efectos secundarios. La liberación de extracto de los compósitos de Chi-CMC-SiO₂ a pH 6,5 se logró en cuatro días y ambos compósitos pueden considerarse como potenciales materiales para aplicaciones biomédicas.

Por último, debido a las propiedades bioactivas de la sílica [232], su presencia en los materiales compósitos proporciona un entorno para la biomineralización. En la enfermedad periodontal, no solo es importante en la liberación local de fármacos, pero también lograr la recuperación del tejido perdido. Los materiales bioactivos pueden promover la regeneración del periodonto dañado a través de esta enfermedad. Los resultados mostraron que sólo el compósito de chi-SiO₂ podría proporcionar un entorno para una posible biomineralización.

En conclusión, los resultados *in vitro* indican que el compósito Chi-CMC-SiO₂ podría ser un carrier eficiente del extracto de *Larrea divaricata* Cav. como una terapia complementaria antioxidante para la enfermedad periodontal. En el caso del compósito de chi-SiO₂, se necesitan más estudios para evaluar su función en la regeneración en el hueso periodontal.

CAPÍTULO 5:

DESARROLLO DE HIDROGELES DE QUITOSANO MODIFICADOS con DDSA Y SU ESTUDIO PRELIMINAR *IN VIVO*



1.Introducción

Hoy en día, el creciente estudio en biomateriales ha permitido una gran versatilidad de su uso en el campo dental. Los andamios biodegradables, como el quitosano, tienen un papel importante en la regeneración del tejido oral [170] y en el desarrollo de sistemas de administración de fármacos [193,202,233–235]. El quitosano es un polímero derivado de la quitina que tiene una buena biocompatibilidad y no presenta toxicidad [236]. Este biopolímero policatiónico se ha procesado exitosamente en hidrogeles [237], nanopartículas [238] y películas [239,240] para muchas aplicaciones biomédicas. Una razón de su alta versatilidad es que pueden modificarse químicamente sus grupos amino e hidroxilo. Es más, su modificación química ofrece una amplia gama de derivados de quitosano [241] con varias aplicaciones en el campo farmacéutico y biomédico [242–244] y tiene la capacidad de cambiar sus propiedades físicas, químicas y mecánicas.

En este sentido, *Rehka et al.*, desarrollaron un derivado de quitosano llamado lauril succinil quitosano con grupos hidrofóbicos e hidrofílicos. Ellos estudiaron la influencia en el perfil de liberación y en la mucoadhesividad entre las partículas de quitosano y su derivado y observaron que las partículas derivatizadas de quitosano minimizaban la liberación de insulina a pH 1,2, siendo adecuadas para un sistema de administración oral de proteínas. Además, eran altamente mucoadhesivas, posiblemente debido a la interacción hidrofóbica de los grupos laurilo con los dominios hidrofóbicos de la mucosa, así como por su potencial zeta negativo. Por otra parte, *Inta et al.*, desarrollaron películas de ftaloilquitosano (DS-g-PHCTS) sintetizadas con dodecenil succinilato que podían mejorar la hidrofobicidad del quitosano y la actividad antibacteriana contra bacterias Gram-positivas. Sus hallazgos sugieren que el DS-g-PHCTS es un candidato prometedor para utilizarse como una película activa antimicrobiana en aplicaciones biomédicas.

El anhídrido dodecenilsuccínico (DDSA) es un reactivo de acetilación que introduce una cadena hidrófoba de 12 carbonos en la estructura de sustratos con sitios reactivos. La modificación química de biopolímeros con DDSA ha demostrado ser bastante prometedora [245,246]. Por ejemplo, la goma arábica es un polisacárido obtenido de árboles de Acacia, que se lo ha modificado con DDSA [247]. Los derivados de DDSA-goma arábica demostraron una mejor capacidad emulsificante cuando aumentaban su contenido hidrófobo, lo que implicaba que tendrían una potencial aplicación para la microencapsulación. Por otra parte, la hidrofobización

de nanocristales de almidón (SNC) con anhídridos tales como el DDSA es una técnica favorable para el medio ambiente [248] y ha demostrado una mejora de la dispersión de los SNC en disolventes no polares o polímeros hidrófobos y, por lo tanto, permitiría ampliar el rango de aplicación del SNC como refuerzos para nanocompuestos de matrices poliméricas hidrofóbicas.

En este capítulo, se modificaron químicamente hidrogeles de quitosano con DDSA para analizar su factibilidad como sistemas de administración de fármacos para el tratamiento de la enfermedad periodontal, evaluando la incorporación y el perfil de liberación de un compuesto ligeramente soluble en agua denominado timol que ya fue introducido en el capítulo 3, con el objetivo de reducir el número de aplicaciones por parte del paciente. La enfermedad periodontal afecta extensamente a las poblaciones humanas y es uno de los principales factores de riesgo para la pérdida de dientes y se caracteriza por la destrucción de las estructuras de soporte de los dientes, incluidos el ligamento periodontal, el hueso alveolar y los tejidos gingivales que conducen a una ruptura del cemento debido a la condición inflamatoria de los tejidos blandos que rodean los dientes [249].

El timol es un compuesto fenólico que posee actividad antioxidante y antimicrobiana. Dado que la enfermedad periodontal es una patología con origen microbiano y la inflamación está presente en todas las etapas de la enfermedad, un compuesto de acción dual podría ayudar al tratamiento de la enfermedad periodontal. Se presenta como un posible sistema de liberación controlada a hidrogeles de quitosano modificados con DDSA cargados con timol y analizamos sus propiedades. Para ello, la modificación de los hidrogeles se corroboró mediante espectros FTIR y ^{13}C RMN, se evaluaron sus propiedades viscoelásticas, la ultraestructura de hidrogeles mediante un análisis SEM, el perfil de liberación, la actividad antimicrobiana y antioxidante. Posteriormente, se realizó una evaluación preliminar *in vivo* en un modelo de periodontitis en rata por mediciones histomorfométricas de los hidrogeles de quitosano modificados y no modificados.

2. Materiales y métodos

2.1 Materiales

El quitosano de baja viscosidad obtenido de cangrejo con viscosidad estructural 66 mPas y desacetilación >75,0%, la lisozima de clara de huevo de gallina (100000 U/mg), el reactivo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

(MTT), el anhídrido dodecenilsuccínico (DDSA) y el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) se compraron de Sigma-Aldrich (St Louis, EE.UU.). El medio de Eagle modificado por Dulbecco, el suero bovino fetal; la penicilina y la estreptomicina se adquirieron en Gibco. Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

2.2. Síntesis de hidrogeles DDSA-quitosano

Se preparó una solución de 20 mg.mL⁻¹ de quitosano en ácido acético al 1% (v/v). Después, se colocó 1 mL de quitosano en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos, que se usó como molde. Luego, se pulverizó una solución de NaOH 1 N sobre la placa y se dejó durante 5 hs a temperatura ambiente. Finalmente, la solución alcalina se eliminó y los hidrogeles sintetizados se lavaron con agua desionizada hasta que se alcanzó un pH neutro. La modificación química de los hidrogeles se llevó a cabo mediante su incubación en una solución de DDSA al 25% P/V durante 2 horas bajo vapores de amoníaco. Después de la modificación, primero se lavaron con etanol absoluto para retirar el exceso de reactivo y más tarde con agua desionizada.

2.3. Caracterización ultraestructural por SEM

Los hidrogeles de quitosano y DDSA-quitosano se analizaron por microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras se fijaron con una solución de glutaraldehído (10% v/v) durante 1 hora a 4°C. Después de la fijación, las muestras se lavaron tres veces con agua desionizada y se congelaron a -80°C. Finalmente, se liofilizaron y se recubrieron con oro por pulverización catódica para su análisis utilizando un microscopio Zeiss SUPRA 40.

2.4. Caracterización por FT-IR y ¹³C RMN

Los espectros infrarrojos de transformada de Fourier (FTIR) de los hidrogeles liofilizados de quitosano y DDSA-quitosano se registraron con un equipo IS de FTIR-Raman Thermo Scientific Nicolet modelo 50, acoplado con un dispositivo de reflexión total atenuado (ATR). El rango de escaneo fue 4000-500 cm⁻¹. Los espectros fueron procesados por el software Thermo Nicolet OMNIC.

Todos los experimentos ¹³C RMN en estado sólido se realizaron a temperatura ambiente en un espectrómetro Bruker Avance II de 300 MHz equipado con una sonda de 4 mm de ángulo mágico de rotación (MAS). Los espectros de estado sólido ¹³C de alta resolución se registraron usando la rampa {1 H} - {13C} CP-MAS. El

tiempo de adquisición fue de 2 ms. La velocidad de rotación fue de 10 kHz para todas las muestras y experimentos. La caracterización se aplicó a los hidrogeles de quitosano modificados y no modificados con DDSA.

2.5. Medidas reológicas

Se midió la reología de los hidrogeles de quitosano y DDSA-quitosano. Primero se realizaron barridos de amplitud para determinar el rango viscoelástico lineal (LVR). Luego, mediante ensayos de corte dinámico se obtuvieron el módulo elástico o de almacenamiento, G' , el módulo viscoso o de pérdida, G'' y la viscosidad compleja (η^*) en función de la frecuencia (ω), en un rango de 0,1 a 500 s^{-1} de los materiales estudiados usando un reómetro rotacional de Anton Paar (MCR-301) provisto con una cámara termotastizada CTD 600. Las pruebas se realizaron usando placas paralelas de 25 mm de diámetro, una tensión de $\gamma = 1,0\%$. Las mediciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente (20°C) y todas las pruebas se realizaron utilizando deformaciones pequeñas para garantizar la linealidad de las respuestas dinámicas. Todas las medidas se repitieron usando diferentes muestras. El ancho de espacio utilizado fue de 1,8-2 mm.

2.6. Incorporación y liberación de timol

Los hidrogeles de quitosano y DDSA-quitosano se incubaron en una solución hidroalcohólica de timol (1,25 $mg \cdot mL^{-1}$) durante 6 hs. Los hidrogeles se lavaron con agua y se añadió 1 mL de buffer fosfato salino (PBS) en la parte superior de cada gel para realizar el ensayo de liberación. El buffer PBS se eliminó a diferentes puntos de tiempo de los hidrogeles y se repuso con medio nuevo. La liberación acumulativa de timol se midió mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. Brevemente, se mezclaron 100 μL de sobrenadante de cada hidrogel con 100 μL de reactivo y 1 mL de solución de Na_2CO_3 (2% p/v). Después de 1 hora de incubación con los reactivos, cada muestra se midió a 725 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Cecil CE 3021, Cambridge, Inglaterra).

2.7. Prueba de actividad antimicrobiana

2.7.1. Método de conteo de placas

La actividad antimicrobiana de los hidrogeles se evaluó contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se añadió una suspensión bacteriana de $1 \cdot 10^6$ UFC. mL^{-1} en PBS a los hidrogeles de quitosano, DDSA-quitosano y DDSA-quitosano

cargados con timol. Los hidrogeles se incubaron durante 24hs, luego se retiró la suspensión bacteriana de los hidrogeles y se realizaron diluciones en serie en solución fisiológica de cada sobrenadante. Finalmente, se extendieron 20 μL de cada solución en placas de agar Luria-Bertani (LB) y se contaron el número de unidades formadoras de colonias. La metodología se repitió una vez más para evaluar el efecto antimicrobiano de los materiales sintetizados después de 2 días.

2.8. Actividad antioxidante

2.8.1. Ensayo DPPH

La capacidad eliminadora de radicales libres evaluó mediante el método de Blois modificado en el que se monitoriza la velocidad de blanqueo del DPPH a una longitud de onda característica en presencia de la muestra [171]. El ensayo se realizó de la siguiente manera: se mezclaron 100 μL de timol extraído de los hidrogeles con 400 μL de buffer Tris pH=7,4 y 500 μL de DPPH 100 μM . La absorbancia se midió a 517 nm. La inhibición de DPPH se calculó mediante la ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = [1 - (A_{\text{muestra}} / A_{\text{DPPHcontrol}})] \times 100$$

donde A es la absorbancia medida.

2.9. Prueba de viabilidad y cultivo celular

Los fibroblastos [3T3] de ratón se cultivaron en botellas de cultivo adherentes con medio de Eagle modificado de Dulbecco modificado de glucosa baja (DMEM) complementado con un 10% de suero fetal bovino y penicilina-estreptomicina al 1%. Se mantuvieron a 37°C en una cámara humidificada al 5% de dióxido de carbono hasta que se alcanzó la confluencia. La cosecha se hizo con una solución de tripsina. Las células se tiñeron con azul tripán y se contaron con una cámara Neubauer. Se sembraron fibroblastos ($4,0 \times 10^4$) en cada pocillo seguido de la adición de 1 mL de medio DMEM completo con glucosa baja. Después de 2 días de incubación, ambos tipos de hidrogeles se añadieron a la placa de 24 pocillos en la parte superior de la capa de fibroblastos y se midió la actividad metabólica celular un día después usando el ensayo de MTT. El medio fue removido y reemplazado por 1 mL de una solución MTT de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en medio fresco. Las muestras se incubaron en una cámara de dióxido de carbono al 5% humidificado durante 4

horas. Posteriormente, las soluciones de MTT se eliminaron, se añadió 1 mL de etanol absoluto y las mezclas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro UV-Visible a 570 nm (Cecil CE 3021, Cambridge, Inglaterra).

2.10. Evaluación *in vivo*

Doce ratas Wistar adultas machos con un peso corporal inicial de 230 a 250 g, se obtuvieron del laboratorio de animales del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires, Argentina. Los animales fueron alojados en jaulas galvanizadas con pisos de malla para mantener las condiciones higiénicas. Las ratas se mantuvieron en jaulas individuales y se expusieron a un ciclo de luz/oscuridad de 12 hs durante todo el estudio. La temperatura ambiente se mantuvo a 21 ± 1 °C con una humedad del 50-60%. Las ratas se mantuvieron de acuerdo con la Guía de Institutos Nacionales de Salud de EE. UU. para el cuidado y uso de animales de laboratorio [250]. Los protocolos para estos experimentos fueron aprobados por la Universidad de Buenos Aires, Argentina y por el Comité local de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires.

La periodontitis inducida por ligadura es una metodología para evaluar el daño periodontal en maxilares de rata. Los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal (2% clorhidrato de xilazina 0,02mL.100g⁻¹ de peso y 5% clorhidrato de ketamina 0,1mL.100g⁻¹ de peso) para inducir EP por medio de ligadura bilateral, con hilo de lino (número 100), alrededor del cuello del primer molar de cada hemimandíbula de la rata según describen *Vacas et al.* Junto con la colocación de la ligadura recibieron analgesia por vía subcutánea.

Los hemimandíbulas se fijaron en una solución de formol al 10% en buffer PBS inmediatamente después de la resección y después fueron descalcificadas en EDTA al 10% pH 7, durante 25 días. Luego, las hemimandíbulas se deshidrataron con etanol y se clarificaron con xilol. Finalmente, el sector que contiene los tres molares inferiores de cada una de las hemimandíbulas descalcificadas se incluyeron en parafina a 56°C. Posteriormente, usando un micrótopo, se obtuvieron secciones orientadas mesio-distalmente de cada primer molar a partir de los bloques de parafina. Las secciones de 7 µm de ancho se tiñeron con hematoxilina y eosina, y

la evaluación histomorfométrica se realizó en microfotografías digitalizadas utilizando un software de imágenes.

Para medir la altura del ligamento periodontal, se marcaron cuatro puntos equidistantes de la cresta alveolar del hueso interradicular, y se dibujó una línea desde cada punto hasta el hueso (**Figura 39**). La longitud de las líneas se midió, y el valor medio fue calculado para obtener la altura del ligamento periodontal de cada sección.

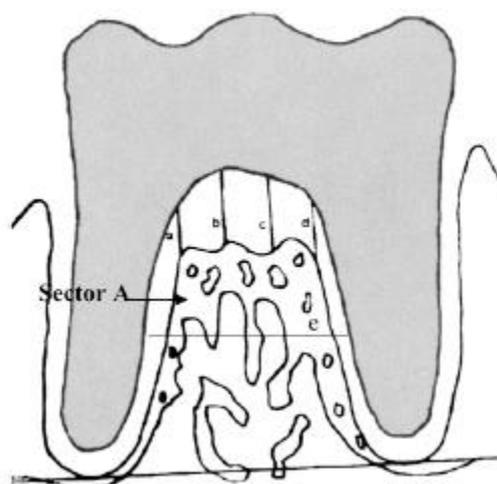


Figura 39. Área estudiada del hueso interradicular: las líneas de la **a** a la **d** indican puntos de medición, y la línea horizontal **e** divide el área ósea interradicular en dos hemi-secciones (Sector A = mitad superior). Para estandarizar el área medida, la línea **a** fue dibujada tangencialmente al área apical de las raíces. “Reimpreso de ref. [251] Derechos de autor (2008) con el permiso por Wiley”

2.11. Análisis estadístico

Los datos se representan como medias \pm SD de al menos triplicados. Las diferencias se analizaron mediante ANOVA (análisis de varianza), seguido de una prueba de comparación múltiple de Bonferroni o una prueba t de Student. La evaluación estadística $p < 0,05$ fue considerada como significativa. Para los resultados *in vivo* se expresaron como valores medios con sus desviaciones estándar (SD). El análisis de varianza de una vía (ANOVA) se utilizó para comparar datos entre grupos. Cuando se encontró una diferencia estadísticamente significativa, se realizó una prueba de Student-Newman-Keul. En todos los análisis, se realizó la prueba de Bartlett para las variaciones homogéneas. La significancia se estableció en el nivel

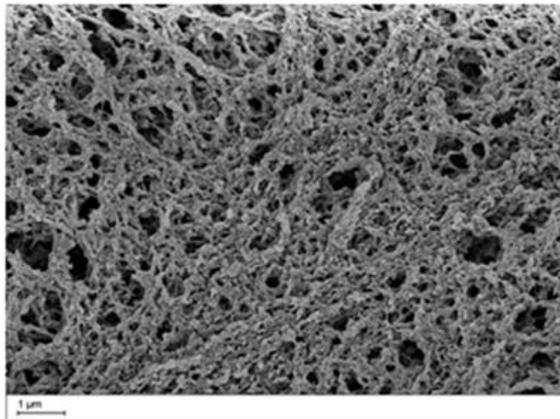
$p < 0,05$. Productos y servicios estadísticos para Windows 11.5 (SPSS, Inc., Chicago, IL) se usaron para análisis estadísticos.

3. Resultados y discusión

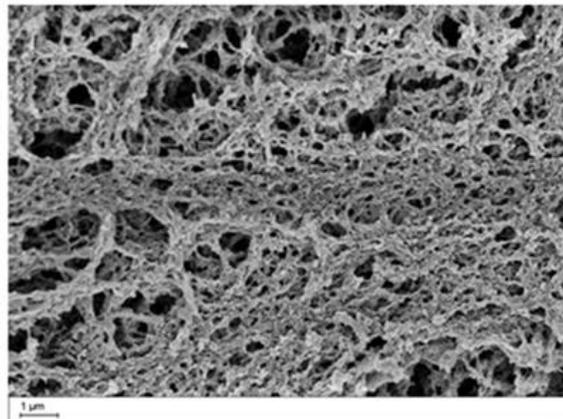
3.1. Síntesis y caracterización de hidrogeles DDSA-quitosano

La ultraestructura de los hidrogeles de DDSA-quitosano y quitosano se evaluaron mediante un análisis SEM. Aunque se logró la modificación química, según se demuestra en las secciones siguientes, no se observaron cambios en la porosidad ni en la red tridimensional de quitosano (**Figura 40A, B**).

A



B



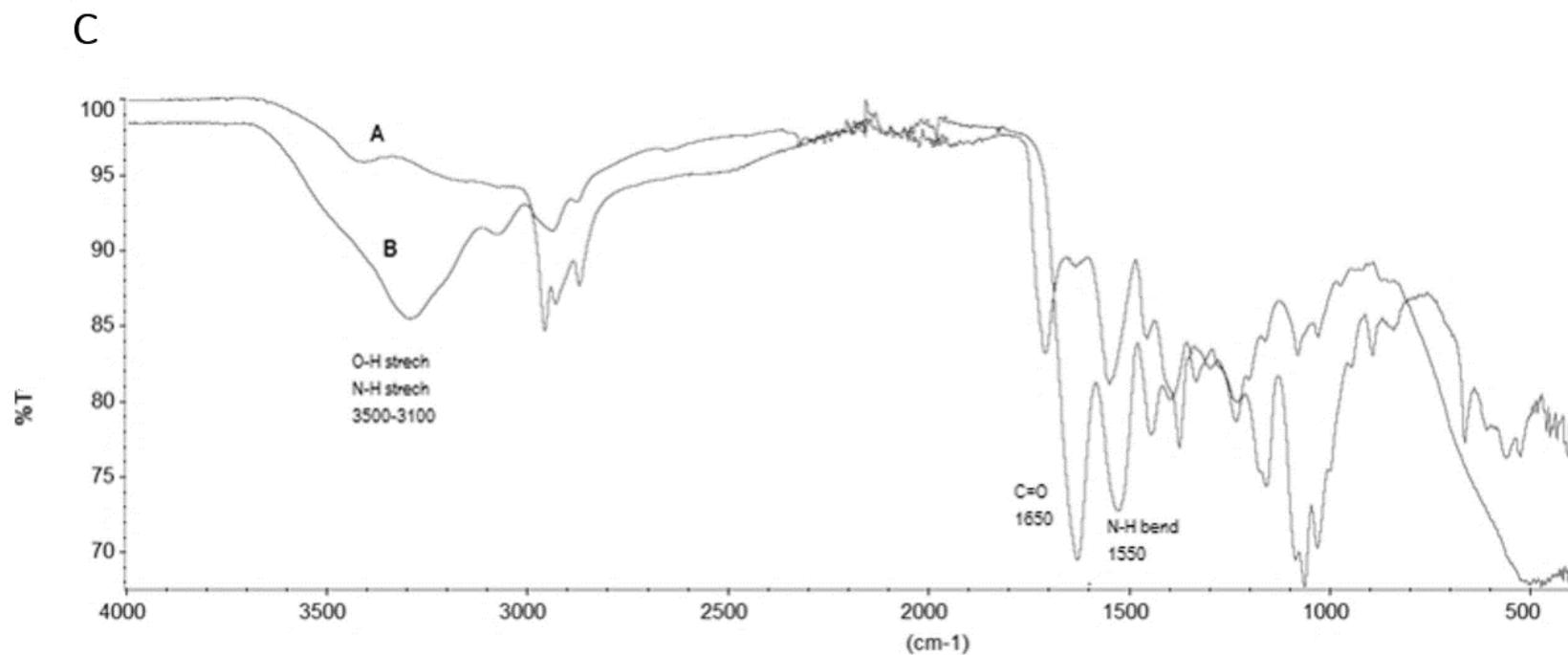


Figura 40. Imágenes representativas de microscopía electrónica de barrido de (A) hidrogel de quitosano modificado con DDSA (B) hidrogel de quitosano (C) Espectros infrarrojos con transformada de Fourier de (A) hidrogel de quitosano modificado con DDSA (B) hidrogel de quitosano

La **Figura 40C** muestra los espectros FTIR de los hidrogeles de quitosano modificados por el efecto del reactivo DDSA (A) y de los hidrogeles de quitosano (B). La acilación del quitosano podría verificarse, ya que en los hidrogeles de DDSA-quitosano se observa una disminución en la banda de estiramiento (OH, NH) a $3100-3500\text{ cm}^{-1}$ y la aparición de una banda de estiramiento (C-H) a $2900-3000\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la incorporación de la cadena hidrocarbonada del DDSA. Por su parte, la señal de 1625 cm^{-1} que puede observarse en el espectro de quitosano y que corresponde a los estiramientos de grupos C=O capaces de formar puentes de hidrógeno, no se observa en el espectro del quitosano modificado. En ese caso, se observa un corrimiento de la señal a 1725 cm^{-1} de los estiramientos C=O libres debido a la imposibilidad de formar puentes de hidrógeno luego del entrecruzamiento con DDSA.

Adicionalmente, para corroborar la modificación química de los hidrogeles se realizó también un análisis por ^{13}C RMN en estado sólido (**Figura 41**).

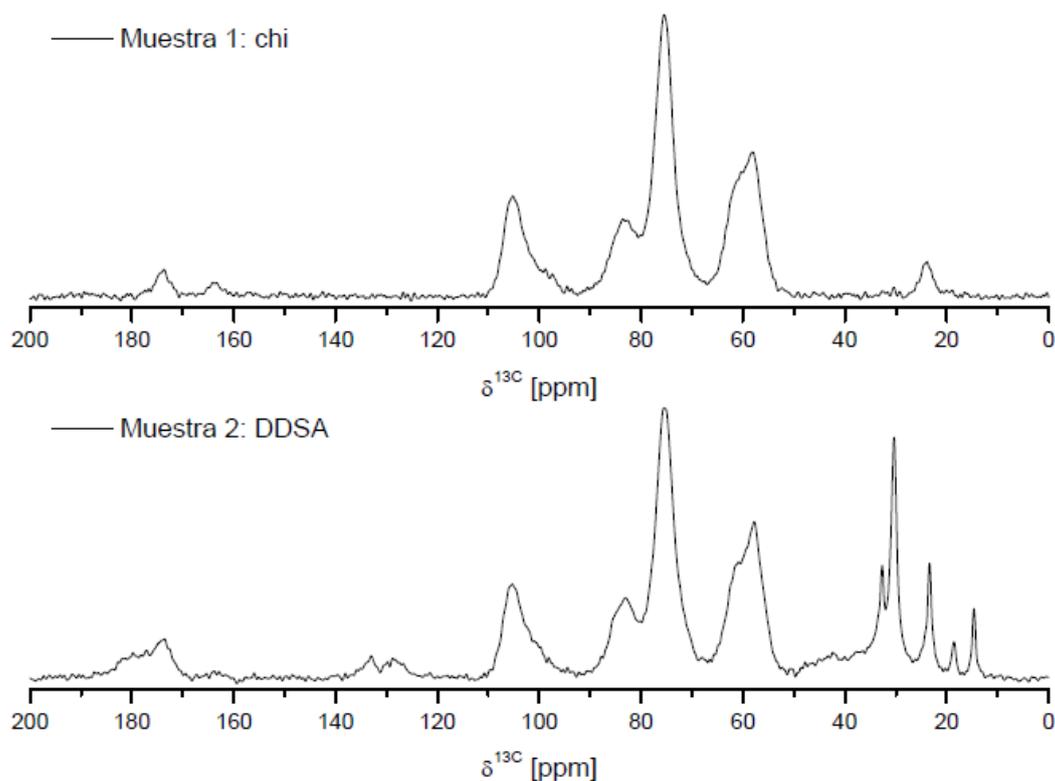


Figura 41. Espectros de ^{13}C RMN en estado sólido de (A) hidrogel de quitosano (B) hidrogel de DDSA-quitosano

Se pudo observar en los espectros que la zona comprendida entre 60-100 ppm correspondientes a las señales de los carbonos de los anillos de quitosano (C_1-C_6) se conservó sin modificaciones en ambas muestras. Sin embargo, en la muestra tratada con DDSA se observan además los carbonos correspondientes a las cadenas carbonadas (40-20ppm) introducidas con el reactivo y los cambios en la zona de 170-180 ppm que podrían indicar la acilación del polímero, ya que representa a los carbonos formando parte de grupos carbonilo. Por su parte, las señales registradas entre 120 y 140 nm en el espectro de quitosano-DDSA son asignadas a los carbonos vinílicos que, en este caso, provienen de la cadena hidrocarbonada que porta el reactivo. Estos resultados concuerdan con otras modificaciones anteriormente realizadas en biopolímeros con DDSA [252].

Además, se evaluaron y compararon las propiedades viscoelásticas entre ambos tipos de hidrogeles (**Figura 42**). La naturaleza viscoelástica de los hidrogeles y su alto contenido de agua minimizan el daño del tejido circundante cuando se implantan en el huésped. Por lo tanto, estas características los hacen buenos candidatos para aplicaciones biomédicas, como por ejemplo para la reparación de lesiones a los sistemas vivos [253]. Por lo tanto, la evaluación de la reología es muy útil para estudiar los cambios microestructurales de materiales con una potencial aplicación biomédica. Las mediciones reológicas mostraron que los valores del módulo de almacenamiento G' eran siempre mayores que los valores del módulo de pérdida G'' , indicando que ambos tipos de hidrogeles presentan un comportamiento predominantemente elástico. Sin embargo, los valores de G' (c.a. 1000) y G'' (c.a. 100) de los hidrogeles de DDSA-quitosano fueron más altos que los hidrogeles de quitosano, indicando que la modificación química con DDSA aumentó tanto G' como G'' . Por lo tanto, los hidrogeles de quitosano modificados demostraron ser más resistentes según la caracterización reológica realizada.

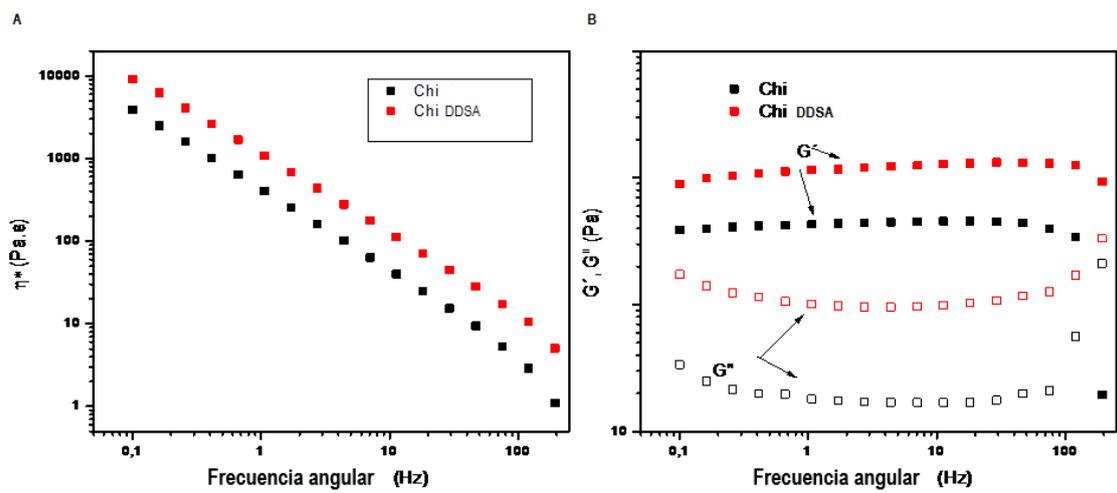


Figura 42. (A) Viscosidad compleja de los hidrogeles de quitosano y DDSA-quitosano frente a la frecuencia. (B) Respuesta viscoelástica de los hidrogeles de quitosano y DDSA-quitosano frente a la frecuencia (G' y G'').

3.2. Estudios de incorporación y liberación de timol a partir de hidrogeles de DDSA-quitosano

El perfil de liberación acumulativo se realizó usando buffer fosfato salino como medio de liberación. Después de 2 días, se liberó el 100% de timol desde los hidrogeles de quitosano. En cambio, el contenido de timol liberado desde los hidrogeles de DDSA-quitosano fue del ~75% (Figura 43). Claramente, el perfil de liberación acumulativo de los hidrogeles de quitosano varió con su modificación por DDSA, por lo que se observó una liberación prolongada de timol hasta siete días. Gracias a la acilación de los grupos funcionales de quitosano con las cadenas hidrocarbonadas del DDSA, se logró una liberación sostenida de timol, dado que este compuesto es poco soluble en agua y la adición de cadenas hidrocarbonadas al hidrogel desfavorece su liberación a un medio acuoso como es el caso del buffer fosfato salino (PBS). Sin embargo, la incorporación de timol no se vio afectada por la modificación química del DDSA. En el caso de los hidrogeles de quitosano fue de $(0,35 \pm 0,03)$ mg y para los hidrogeles de DDSA-quitosano de $(0,33 \pm 0,03)$ mg.

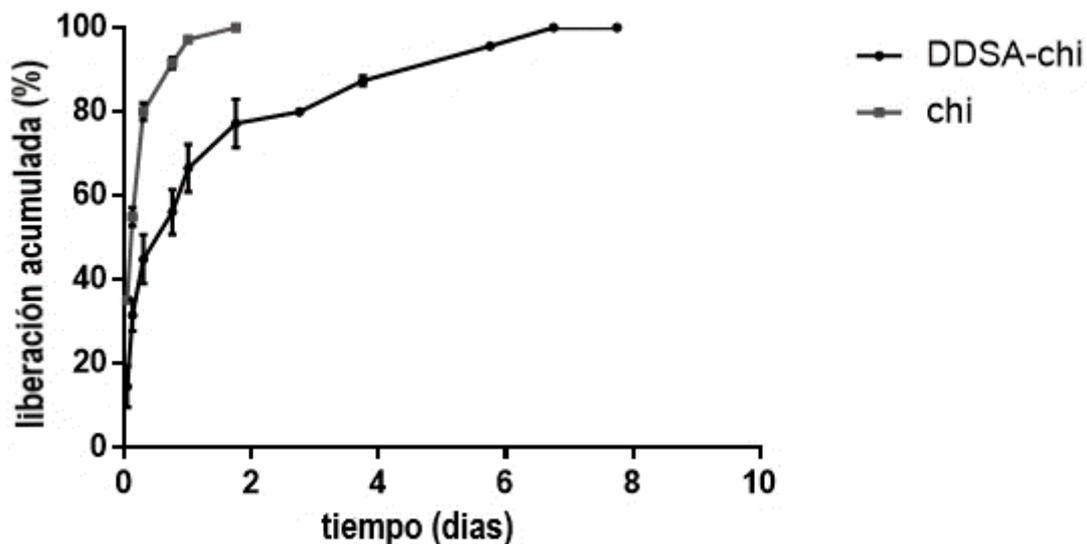


Figura 43. Liberación acumulada en PBS de timol desde hidrogel DDSA-chitosano y chitosano

3.3. Estudio antimicrobiano de los hidrogel DDSA-chitosano

La aparición de antibióticos y la resistencia a los antimicrobianos de los biofilms orales ha incrementado el interés en las plantas medicinales para tratar las patologías periodontales. De hecho, muchos estudios *in vivo* e *in vitro* han evaluado el papel de las plantas medicinales en el tratamiento de la enfermedad periodontal [254].

El timol (2-isopropil-5-metilfenol) es un fenol monoterpeneo presente en los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare*. Éste posee actividad antibacteriana hacia una amplia gama de especies implicando un gran potencial como componente bioactivo en el campo farmacéutico [143]. De hecho, muchos sistemas de administración de fármacos y apósitos para heridas han sido desarrollados anteriormente [255,256].

En este capítulo se intenta continuar con los ensayos presentados en el primer capítulo de la tesis con el fin de mejorar el perfil de liberación del principio activo para intentar reducir el número de aplicaciones del hidrogel a las cuales debe someterse el paciente. Para ello, evaluamos la actividad antimicrobiana de los hidrogel DDSA-chitosano contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Para ambos tipos de bacterias, los hidrogel cargados con timol presentaron actividad antimicrobiana durante 48 horas. Sin embargo, los hidrogel de timol-DDSA exhibieron un mayor efecto sobre *Staphylococcus aureus*, donde el UFC.mL⁻¹ disminuyó siete unidades logarítmicas, mientras que para *P. aeruginosa* la

disminución se produjo desde $\sim 10^8$ a $\sim 10^7$. Además, en ambas bacterias se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los hidrogeles de quitosano y los hidrogeles de DDSA sin timol. Estos hallazgos sugieren que la modificación química de DDSA mejora las propiedades antimicrobianas del quitosano y esto podría estar relacionado con la interacción hidrofóbica de las cadenas de hidrocarburos con las paredes de las células bacterianas (**Figura 44A,B**). Aunque las bacterias *S. aureus* y *P. aeruginosa* no pertenecen a la microbiota oral ni están involucradas en la patogenia de la enfermedad periodontal, se emplearon como bacterias modelo dada su susceptibilidad frente al timol y además porque se las han encontrado en muestras de biofilm subgingival humano [181].

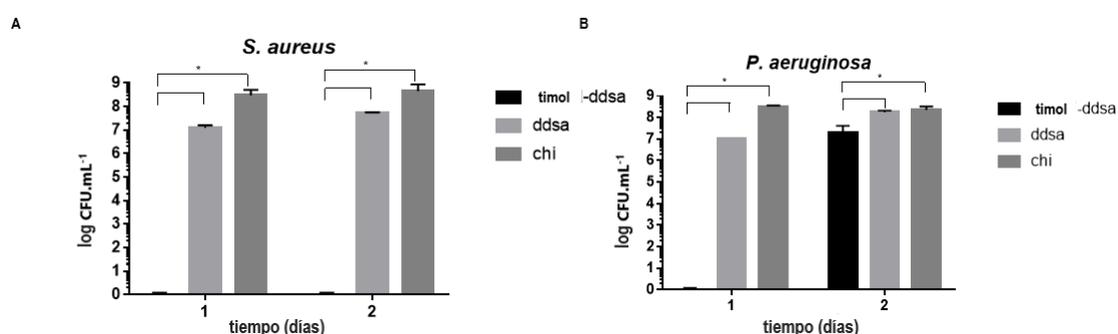


Figura 44. (A) Actividad antimicrobiana de hidrogeles de DDSA-quitosano con timol contra *Staphylococcus aureus* mediante el método de recuento en placa durante un período de 2 días (B) Actividad antimicrobiana de los hidrogeles de DDSA-quitosano con timol contra *Pseudomonas aeruginosa* por método de recuento en placa durante un período de 2 días. ($p < 0,05$)

3.4. Estudio antioxidante de los hidrogeles DDSA-quitosano

El estrés oxidativo, un desequilibrio entre la carga de oxidantes y la capacidad antioxidante, es un potencial indicador de la progresión de enfermedades como el cáncer, la aterosclerosis, el infarto de miocardio y la enfermedad periodontal [257]. Muchos estudios evaluaron marcadores de estrés oxidativo en el fluido crevicular gingival de pacientes con periodontitis crónica y se observó que el tratamiento quirúrgico mejoró significativamente el equilibrio redox en estos pacientes [258]. En consecuencia, el desarrollo de sistemas de administración de antioxidantes puede ayudar a tratar los efectos nocivos de la inflamación crónica desarrollada en la enfermedad periodontal. En este sentido, los hidrogeles de DDSA-quitosano cargados con timol presentaron actividad scavenger durante cinco días, lo que indica una actividad antioxidante sostenida (**Figura 45**). Este resultado es

consistente con el perfil de liberación, en el que el timol se libera durante siete días. Además, dado que los compuestos fenólicos pueden mostrar actividades antioxidantes y pro-oxidantes a diferentes dosis [259], no es sorprendente que el timol demostrara un comportamiento dual cuando se carga en hidrogeles de DDSA-quitosano. En dosis altas, se pudo observar una actividad antimicrobiana, probablemente debido a daños en la membrana celular y al ADN. Sin embargo, cuando se libera una concentración baja puede tener un efecto protector en las células debido a su capacidad de eliminación de radicales libres.

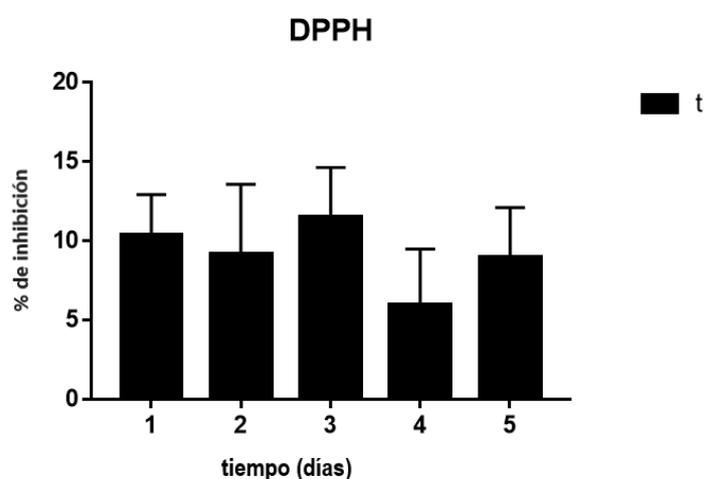


Figura 45. Actividad de barrido de DPPH de los hidrogeles DDSA-quitosano con timol (t)

3.5. Estudios de citocompatibilidad y evaluación preliminar *in vivo* de los hidrogeles DDSA-quitosano

Para realizar los estudios de citocompatibilidad en los hidrogeles DDSA-quitosano se emplearon células [3T3] fibroblásticas debido a su función en el proceso de regeneración tisular. De hecho, se ha observado que algunos derivados del quitosano han mejorado la proliferación de células de fibroblastos de la piel. Por ejemplo, el carboximetil quitosano sulfato (CMCS) con un contenido de sulfato de 26,26% a la concentración de 100 g.mL⁻¹ promovió la proliferación de fibroblastos cutáneos [260].

Para evaluar los efectos de los hidrogeles DDSA-quitosano sobre la proliferación de fibroblastos [3T3] de ratón se realizó el método de MTT. Este tipo de hidrogel presentó una viabilidad celular menor en comparación con los hidrogeles de quitosano no modificados* ($p < 0,05$) (Figura 46). En consecuencia, la adición de

cadena de hidrocarburo al polímero de quitosano, que modifica su grado de desacetilación, probablemente podría interferir con la proliferación de fibroblastos [3T3]. Estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos por *Wood et al.*, que revelaron que los quitosanos con grados relativamente altos de desacetilación estimulan fuertemente la proliferación de fibroblastos dérmicos humanos mientras que las muestras con niveles más bajos de desacetilación muestran menos actividad.

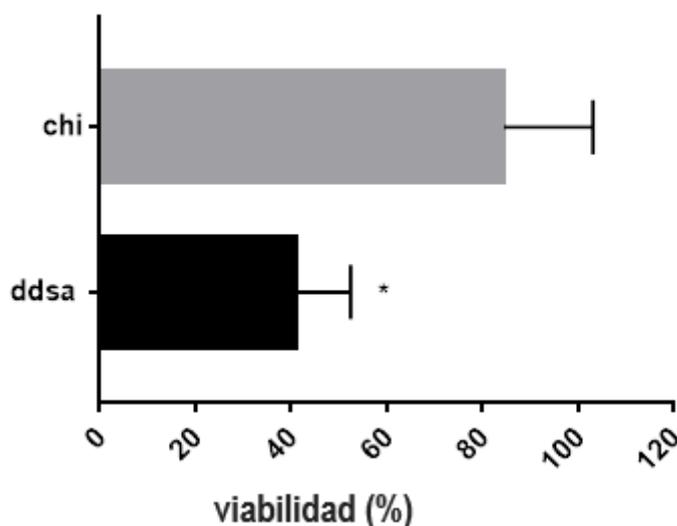


Figura 46. Viabilidad de fibroblastos [3T3] murinos frente al control. ($p < 0,05$) según test de Student.

Considerando que la citotoxicidad de los materiales puede ser clasificada según la viabilidad celular relativa a los controles, donde un nivel de actividad en comparación con los controles de $<30\%$ es una citotoxicidad grave, entre 30 y 60% una citotoxicidad moderada, entre 60 y 90% una citotoxicidad leve, y $>90\%$ no tiene citotoxicidad [225,226]; un valor del $\sim 40\%$ como es el caso de los hidrogeles DDSA-quitosano se corresponde a un efecto citotóxico moderado y los materiales con este efecto en el ensayo de MTT pueden ser considerados para aplicaciones biomédicas [227].

En paralelo, se llevó a cabo un estudio preliminar *in vivo* en ratas Wistar para evaluar los hidrogeles modificados y no modificados con DDSA en un modelo de enfermedad periodontal inducida por ligadura en rata. Los hidrogeles se aplicaron por vía tópica con una jeringa con cánula cada dos días durante una semana (**Figura 47**) luego de provocar la periodontitis por 24hs.

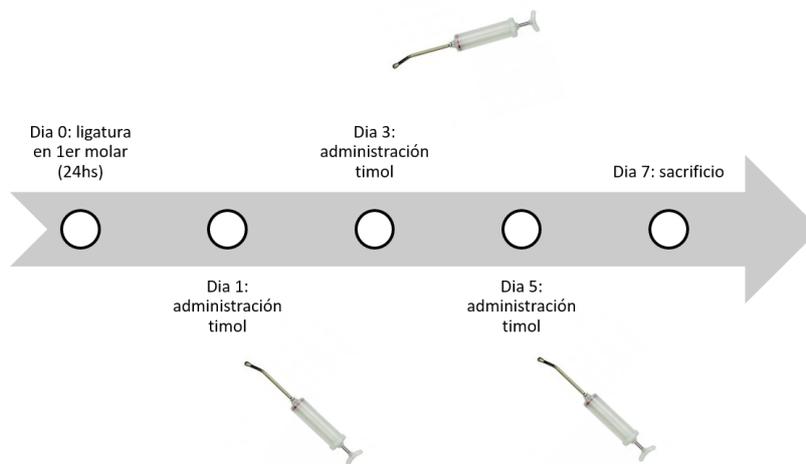


Figura 47. Protocolo evaluación *in vivo*

Después de siete días, los animales se sacrificaron y se realizó una evaluación histológica través de medidas histomorfométricas a secciones mesiodistales histológicas de las mandíbulas teñidas con hematoxilina y eosina (**Figura 48**).

Dado que la medición de la altura del ligamento periodontal de las secciones histológicas puede estimar el daño periodontal, puede decirse que los hidrogeles de quitosano cargados con timol mostraron menores signos de daño en comparación con los otros hidrogeles (**Tabla 3**).

Tabla 3. Altura del ligamento periodontal (hPL, μm).

GRUPOS	Media \pm SD
control sin periodontitis	124,3 \pm 17,5 ^a
timol-quitosano	217,7 \pm 69,8 ^b
DDSA-quitosano	304,1 \pm 8,7 ^c
quitosano	342,8 \pm 11,3 ^c
timol-DDSA-quitosano	364,1 \pm 76,8 ^{c,d}
control con periodontitis	441,0 \pm 61,5 ^d

Letras diferentes significa diferencia significativa ($p < 0,05$)

Estadística: ANOVA+SNK. SNK: Student-Newman-Keuls

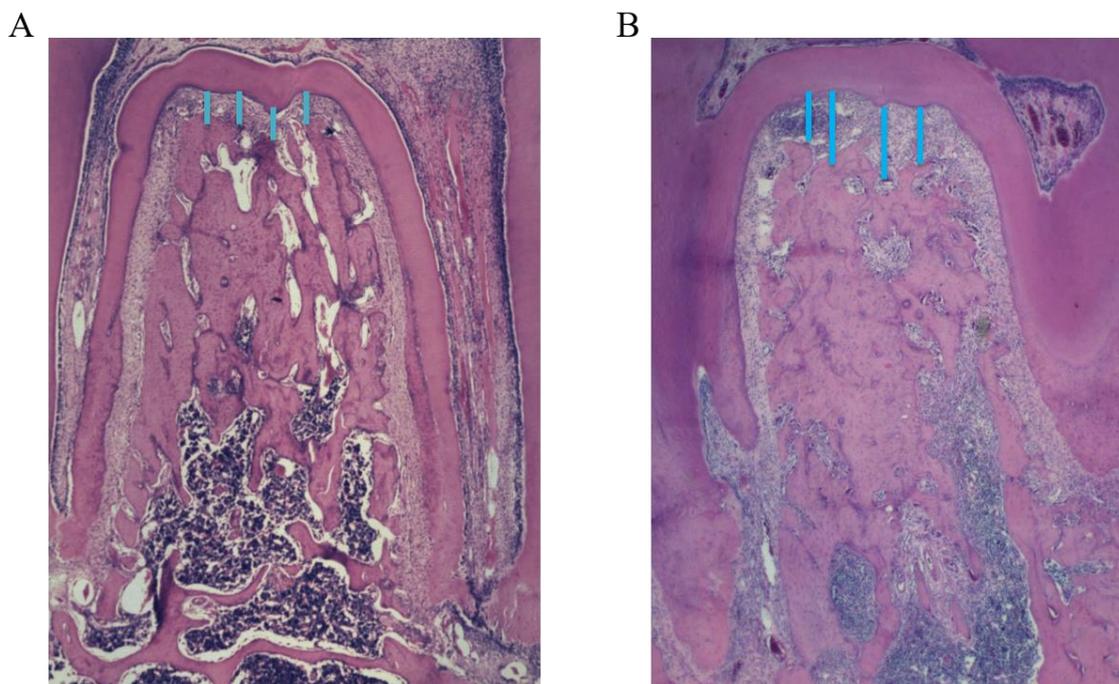


Figura 48. Corte mesio-distal histológico teñido con hematoxilina y eosina aumento 40X (A) Control sin periodontitis (B) Grupo quitosano. Las líneas azules marcan la altura del ligamento periodontal.

4. Conclusiones

El uso de biopolímeros como sistemas de liberación sostenida de activos se ha ido afianzando a lo largo de los años [261]. La modificación química de ellos puede traducirse, por ejemplo, en la generación de materiales que responden a estímulos o de materiales con los cuales se pueda lograr una liberación sostenida de activos. Si bien las modificaciones químicas en polímeros sintéticos están mucho más estudiadas, la modificación de biopolímeros está en creciente investigación ya que estos presentan una buena biocompatibilidad y no presentan toxicidad [262].

Por otra parte, los sistemas de administración local de fármacos para el tratamiento de la enfermedad periodontal como antimicrobianos, antioxidantes y antiinflamatorios también están en pleno desarrollo ya que ofrecen una alternativa prometedora y no invasiva para los pacientes crónicos de esta enfermedad. Además, los activos de origen natural, con una acción dual, como el timol, podría tener resultados positivos para el tratamiento.

Los resultados presentados en este capítulo acerca de la caracterización de los materiales desarrollados indicaron la efectiva modificación química de los hidrogeles de quitosano conservando su ultraestructura y aumentando sus propiedades reológicas. Una vez incorporado el activo, se realizó el perfil de liberación, observando que el timol se liberó *in vitro* a partir de hidrogeles de DDSA-quitosano por aproximadamente siete días y de hidrogeles de quitosano solo por tres días. Estos resultados coinciden con la modificación química con DDSA realizada. Por otra parte, los ensayos antimicrobianos indicaron que los hidrogeles tienen actividad antimicrobiana durante 2 días y que la modificación química *per sé* implica un efecto antibacteriano y los ensayos antioxidantes indicaron que por 5 días mantiene la actividad scavenger.

Por otra parte, los hidrogeles modificados presentaron una citocompatibilidad moderada frente a fibroblastos [3T3] por 24 hs indicando su potencial uso en el área biomédica y en los ensayos preliminares *in vivo* en un modelo murino con una aplicación local de los hidrogeles cada dos días durante una semana, solo los hidrogeles de quitosano cargados con timol mostraron señales menores de daño tisular periodontal. Se necesitan más estudios para tener una evaluación detallada de los hidrogeles en el rendimiento *in vivo*. Sin embargo, dados los resultados obtenidos con una aplicación de los hidrogeles cada 2 días, fueron más efectivos los hidrogeles de timol-quitosano.

CAPÍTULO 6:
CONCLUSIONES GENERALES

Un biomaterial es cualquier materia o superficie que interactúa con sistemas vivos [263]. Los biomateriales se pueden obtener de la naturaleza o ser sintetizados en el laboratorio utilizando una variedad de diferentes materiales (metálicos, polímeros, cerámicas). Además, son ampliamente utilizados diariamente en aplicaciones dentales, de cirugía y en sistemas de liberación de fármacos. Los biomateriales naturales como el colágeno, la gelatina, la fibrina, el quitosano y el ácido hialurónico han sido ampliamente utilizados para la regeneración del tejido *in situ* [264,265]. En general, los biomateriales naturales tienen excelentes propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad.

Los materiales dentales siempre han sido una herramienta útil en odontología. Su uso está relacionado con la ortodoncia, propósitos restaurativos, endodoncia e incluso estética. La mejora de los resultados en la clínica ha demostrado sus ventajas en la práctica dental. Los materiales dentales involucran varios tipos de materiales tales como metales, cerámicas y orgánicos. Cada tipo de material con sus características inherentes reflejan diferentes propiedades mecánicas, ópticas y biológicas y estas diferencias entre otras se consideran en la selección por el odontólogo para el tratamiento de enfermedades orales.

Los materiales dentales han evolucionado debido a las necesidades del paciente y el creciente conocimiento en biomateriales y patología oral [266] (Figura 49).

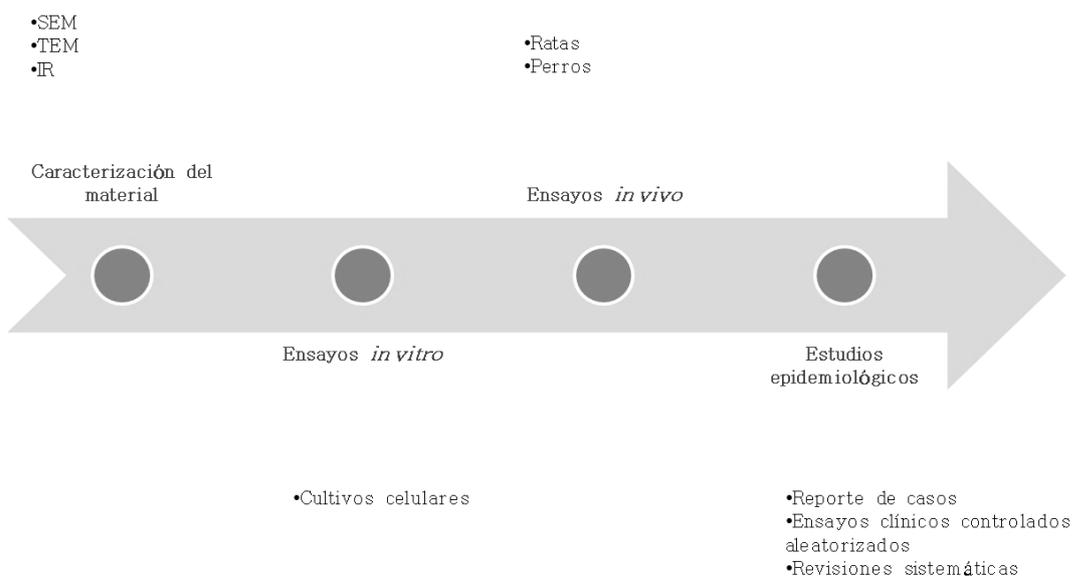


Figura 49. Representación esquemática de la evolución del desarrollo de los materiales dentales

Están en continuo desarrollo con el objeto de aumentar su calidad y biocompatibilidad, así como disminuir su toxicidad (**Figura 50**). Gran cantidad de polímeros de origen natural como el almidón, colágeno, gelatina, alginato, celulosa y quitina se han reportado y se usan actualmente en la regeneración de tejidos [267]. Actualmente, la sílica, el colágeno y el quitosano han ganado gran interés en la salud oral debido a sus varias aplicaciones clínicas. La sílica ha mejorado las propiedades mecánicas de materiales orgánicos. Además, en la última década ha atraído mucha atención el uso de polímeros y materiales mesoporosos de sílica como sistemas de liberación de fármacos [186,268].

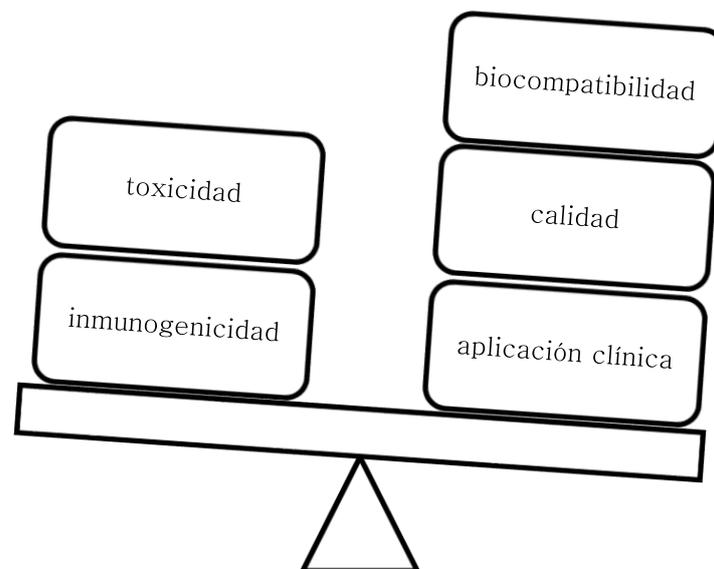


Figura 50. Representación esquemática del equilibrio entre las ventajas y desventajas de los nuevos biomateriales.

La salud oral proporciona calidad de vida [182]. La mayoría de las personas tiene caries dentales y varios factores como el tabaquismo, la falta de higiene oral y la genética promueve el desarrollo de enfermedades orales que pueden terminar en pérdida de dientes. Dado que hallazgos clínicos demuestran buenas perspectivas en la utilización de biomateriales para el tratamiento de enfermedades orales [269], el desarrollo de nuevos biomateriales que actúen como carriers de activos o para regeneración de tejidos podrían optimizar el tratamiento.

Adicionalmente, nuevos activos son requeridos para el tratamiento de enfermedades gingivoperiodontales. El ibandronato es un anti-resorptivo que si bien se lo ha relacionado con la inducción de osteonecrosis de mandíbula cuando es administrado por vía sistémica, cuando es aplicado localmente ha demostrado buenos resultados en la fijación de implantes [270]. Es más, *Veena et al.* ha demostrado que la liberación local del bifosfonato alendronato ha obtenido mayor efectividad en relación a parámetros clínicos y radiológicos en comparación al placebo en el tratamiento de periodontitis.

Por otra parte, el uso de activos de origen natural para el tratamiento de enfermedades gingivoperiodontales ha recobrado mucha importancia dados los mecanismos de resistencia a los medicamentos desarrollados por las bacterias presentes en el biofilm bucal con el posible uso de plantas medicinales (extractos crudos, aceites esenciales y compuestos purificados) como agentes bioactivos con un efecto antibiofilm contra bacterias patógenas orales [271]. Paralelamente, el uso de algunos antioxidantes podría mejorar los parámetros clínicos periodontales [140], dando lugar a la opción de la terapia antioxidante adjuvante como tratamiento de la enfermedad periodontal. La enfermedad periodontal se inicia por la presencia de una biopelícula subgingival y está modulada por la respuesta inflamatoria e inmune. Muchos estudios sostienen que el equilibrio dinámico entre especies reactivas de oxígeno y antioxidantes podría desempeñar un papel en la patogenia de la enfermedad periodontal [211]. De hecho, estudios *in vitro* de biopsias gingivales revelaron una actividad disminuida de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), alentando la hipótesis de que estas enzimas evitan la producción excesiva de ROS y, por lo tanto, la curación periodontal [212]. Debido a la relación entre ROS y la patogenia de la enfermedad periodontal, la administración de suplementos antioxidantes podría ayudar a tratar los signos y síntomas de esta enfermedad [215].

En este sentido, varios extractos de plantas han demostrado ser útiles para la inflamación de la cavidad bucal [216,217]. Por lo tanto, un estudio detallado de un extracto de planta en un carrier adecuado para el tratamiento de la enfermedad periodontal podría tener relevancia en el tratamiento de la periodontitis.

El enfoque de esta tesis se realiza en función de los biomateriales colágeno, quitosano y sílica, que son representantes clave de una proteína, un polisacárido y

un material inorgánico. Los biomateriales para su aplicación biomédica deben poseer algunas características básicas tales como: (i) microestructura y propiedades mecánicas adecuadas (ii) topografía y química de la superficie apropiada (iii) biodegradabilidad y productos de degradación no citotóxicos, (iv) tecnología de fabricación simple y rentable. Además, estos materiales deben proporcionar un microambiente específico que incluya estructuras físicas únicas, composición química especial, propiedades superficiales y en lo posible bioseñales para dirigir el comportamiento celular. Durante la tesis se caracterizó exhaustivamente a los biomateriales diseñados ya que cada tipo de material por sus características inherentes refleja diferentes propiedades mecánicas, ópticas y biológicas y se estudió como estos factores influyen en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos locales para el tratamiento de la enfermedad periodontal.

Se logró desarrollar materiales con potencial para el tratamiento de la enfermedad periodontal tanto en su fase temprana a través de la liberación de agentes antimicrobianos que controlen la placa dental como en etapas más avanzadas donde los antioxidantes pueden jugar un papel importante en el control de la inflamación y progresión de la enfermedad. También se evaluó el efecto estimulador de la regeneración ósea de la sílica que sería fundamental una vez instalada la enfermedad y afectado el hueso alveolar.

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS

- [1] I. Needleman, C. McGrath, P. Floyd, A. Biddle, Impact of oral health on the life quality of periodontal patients, *J. Clin. Periodontol.* 31 (2004) 454–457.
- [2] K.R. Fischer, I. Lindner, S. Fickl, Implant treatment in periodontally compromised subjects—quality of life and patient satisfaction, *Clin. Oral Investig.* 20 (2016) 697–702.
- [3] A. Stavropoulos, A. Sculean, D.D. Bosshardt, D. Buser, B. Klinge, Pre-clinical in vivo models for the screening of bone biomaterials for oral/craniofacial indications: focus on small-animal models, *Periodontol.* 2000. 68 (2015) 55–65.
- [4] K.T. Trifković, N.Z. Milašinović, V.B. Djordjević, M.T.K. Krušić, Z.D. Knežević-Jugović, V.A. Nedović, B.M. Bugarski, Chitosan microbeads for encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) polyphenols, *Carbohydr. Polym.* 111 (2014) 901–907.
- [5] I. Ayensu, J.C. Mitchell, J.S. Boateng, In vitro characterisation of chitosan based xerogels for potential buccal delivery of proteins, *Carbohydr. Polym.* 89 (2012) 935–941.
- [6] A.L.A. Batista, R. Diógenes Alves Uchôa Lins, R. de Souza Coelho, D. do Nascimento Barbosa, N. Moura Belém, F.J. Alves Celestino, Clinical efficacy analysis of the mouth rinsing with pomegranate and chamomile plant extracts in the gingival bleeding reduction, *Complement. Ther. Clin. Pract.* 20 (2014) 93–98.
- [7] T.M. Hearnden V1, Sankar V, Hull K, Juras DV, Greenberg M, Kerr AR, Lockhart PB, Patton LL, Porter S, New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease, *Adv Drug Deliv Rev.* 64 (2012) 16–28.
- [8] J. WZ, Y. Cai, L. HY, Chitosan-based spray-dried mucoadhesive microspheres for sustained oromucosal drug delivery, *Powder Technol.* 312 (2017) 124–132.
- [9] G.M. Ribeiro SD, -Rodrigues Filho G, Meneguim AB, Prezotti FG, Boni FI, Cury BSF, Cellulose triacetate films obtained from sugarcane bagasse: Evaluation as coating and mucoadhesive material for drug delivery systems, *Polym.*,

- Carbohydr. (2016) 764–774.
- [10] M. Catauro, F. Bollino, F. Papale, M. Gallicchio, S. Pacifico, Influence of the polymer amount on bioactivity and biocompatibility of SiO₂/PEG hybrid materials synthesized by sol-gel technique, *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 48 (2015) 548–555.
- [11] J.E. Glim, M. Egmond, F.B. Niessen, V. Everts, R.H.J. Beelen, Detrimental dermal wound healing: What can we learn from the oral mucosa?, *Wound Repair Regen.* 21 (2013) 648–660.
- [12] P.W. Wertz, D.C. Swartzendruber, C.A. Squier, Regional variation in the structure and permeability of oral mucosa and skin, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 12 (1993) 1–12.
- [13] G.K. Johnson, C.A. Squier, W.T. Johnson, G.L. Todd, Blood flow and epithelial thickness in different regions of feline oral mucosa and skin, *J. Oral Pathol. Med.* 16 (2018) 317–321.
- [14] B. Fonseca-Santos, M. Chorilli, An overview of polymeric dosage forms in buccal drug delivery: State of art, design of formulations and their in vivo performance evaluation, *Mater. Sci. Eng. C.* 86 (2018) 129–143.
- [15] A.L. de Almeida Pdel V, Grégio AM, Machado MA, de Lima AA, Saliva composition and functions: a comprehensive review, *J Contemp Dent Pr.* 9(3): (2008) 72–80.
- [16] L.-P. C, The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis, *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 11 (2006) 449–55.
- [17] R.G. Schipper, E. Silletti, M.H. Vingerhoeds, Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects, *Arch. Oral Biol.* 52 (2007) 1114–1135.
- [18] M. Costalonga, M.C. Herzberg, The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries, *Immunol. Lett.* 162 (2014) 22–38.
- [19] L. Feller, M. Altini, R.A.G. Khammissa, R. Chandran, M. Bouckaert, J. Lemmer, Oral mucosal immunity, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* 116 (2013) 576–583.

- [20] E.M. Golebiewska, A.W. Poole, Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond, *Blood Rev.* 29 (2015) 153–162.
- [21] E. Kolaczowska, P. Kubes, Neutrophil recruitment and function in health and inflammation, *Nat. Rev. Immunol.* 13 (2013) 159.
- [22] G.I.I. Broughton, J.E. Janis, C.E. Attinger, The Basic Science of Wound Healing, *Plast. Reconstr. Surg.* 117 (2006) 12–34.
- [23] J.E. Glim, V. Everts, F.B. Niessen, M.M. Ulrich, R.H.J. Beelen, Extracellular matrix components of oral mucosa differ from skin and resemble that of foetal skin, *Arch. Oral Biol.* 59 (2014) 1048–1055.
- [24] N.A. Coolen, K.C.W.M. Schouten, E. Middelkoop, M.M.W. Ulrich, Comparison between human fetal and adult skin, *Arch. Dermatol. Res.* 302 (2010) 47–55.
- [25] M. Chiquet, C. Katsaros, D. Kleetsas, Multiple functions of gingival and mucoperiosteal fibroblasts in oral wound healing and repair, *Periodontol.* 2000. 68 (2015) 21–40.
- [26] M. Padial-Molina, J.T. Marchesan, A.D. Taut, Q. Jin, W. V Giannobile, H.F. Rios, Methods to Validate Tooth-Supporting Regenerative Therapies BT - Odontogenesis: Methods and Protocols, in: C. Kioussi (Ed.), Humana Press, Totowa, NJ, 2012: pp. 135–148.
- [27] R.J. Genco, W.S. Borgnakke, Risk factors for periodontal disease, *Periodontol.* 2000. 62 (2013) 59–94.
- [28] H. Birkedal-Hansen, Role of Matrix Metalloproteinases in Human Periodontal Diseases, *J. Periodontol.* 64 (1993) 474–484.
- [29] G. Sapna, S. Gokul, K. Bagri-Manjrekar, Matrix metalloproteinases and periodontal diseases, *Oral Dis.* 20 (2013) 538–550.
- [30] S.A. Hienz, S. Paliwal, S. Ivanovski, Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis, *J. Immunol. Res.* 2015 (2015) ID 615486.
- [31] X.G. and C.S. Y. Zhang, H. Sun, X. Song, Biomaterials for periodontal tissue regeneration, *Rev. Adv. Mater. Sci.* 40 (2015) 209–214.

- [32] A. Leszczyńska, P. Buczko, W. Buczko, M. Pietruska, Periodontal pharmacotherapy – an updated review, *Adv. Med. Sci.* 56 (2011) 123–131.
- [33] C.J. Smiley, S.L. Tracy, E. Abt, B.S. Michalowicz, M.T. John, J. Gunsolley, C.M. Cobb, J. Rossmann, S.K. Harrel, J.L. Forrest, P.P. Hujuel, K.W. Noraian, H. Greenwell, J. Frantsve-Hawley, C. Estrich, N. Hanson, Systematic review and meta-analysis on the nonsurgical treatment of chronic periodontitis by means of scaling and root planing with or without adjuncts, *J. Am. Dent. Assoc.* 146 (2015) 508–524.e5.
- [34] A.P. Moreno Villagrana, J.F. Gómez Clavel, Antimicrobial or Subantimicrobial Antibiotic Therapy as an Adjunct to the Nonsurgical Periodontal Treatment: A Meta-Analysis, *ISRN Dent.* 2012 (2012) ID 581207.
- [35] J.Y.S. and J. Silvent, N. Nassif, C. Helary, T. Azais, M.M.G. Guille, Collagen Osteoid-Like Model Allows Kinetic Gene Expression Studies of Non-Collagenous Proteins in Relation with Mineral Development to Understand Bone Biomineralization, *PLoS One.* 8 (2013) e57344.
- [36] C. Helary, M. Zarka, M.M. Giraud-Guille, Fibroblasts within concentrated collagen hydrogels favour chronic skin wound healing, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 6 (2011) 225–237.
- [37] C. Helary, B. Rodrigues-Sanchez, S. Vigier, M.-M.G. Guille, Dense fibrillar collagen matrices to analyse extracellular matrix receptor function, *Pathol. Biol.* 60 (2012) 7–14.
- [38] C. Helary, A. Abed, G. Mosser, L. Louedec, D. Letourneur, T. Coradin, M.M. Giraud-Guille, A. Meddahi-Pellé, Evaluation of dense collagen matrices as medicated wound dressing for the treatment of cutaneous chronic wounds, *Biomater. Sci.* 3 (2015) 373–382.
- [39] M.V. Tuttolomondo, J.M. Galdopórpora, L. Trichet, H. Voisin, T. Coradin, M.F. Desimone, Dye–collagen interactions. Mechanism, kinetic and thermodynamic analysis, *RSC Adv.* 5 (2015) 57395–57405.
- [40] C.A. Miles, N.C. Avery, V. V Rodin, A.J. Bailey, The Increase in Denaturation Temperature Following Cross-linking of Collagen is Caused by Dehydration of the Fibres, *J. Mol. Biol.* 346 (2005) 551–556.

- [41] P.L. Chandran, D.C. Paik, J.W. Holmes, Structural mechanism for alteration of collagen gel mechanics by glutaraldehyde crosslinking, *Connect. Tissue Res.* 53 (2012) 285–97.
- [42] S. Heinemann, T. Coradin, M.F. Desimone, Bio-inspired silica-collagen materials: applications and perspectives in the medical field, *Biomater. Sci.* 1 (2013) 688–702.
- [43] M.F. Desimone, C. Helary, G. Mosser, M.-M. Giraud-Guille, J. Livage, T. Coradin, Fibroblast encapsulation in hybrid silica-collagen hydrogels, *J. Mater. Chem.* 20 (2010) 666–668.
- [44] M.F. Desimone, C. Hélar, S. Quignard, I.B. Rietveld, I. Bataille, G.J. Copello, G. Mosser, M.-M. Giraud-Guille, J. Livage, A. Meddahi-Pellé, T. Coradin, In vitro Studies and Preliminary In vivo Evaluation of Silicified Concentrated Collagen Hydrogels, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 3 (2011) 3831–3838.
- [45] M.L. Foglia, D.E. Camporotondi, G.S. Alvarez, S. Heinemann, T. Hanke, C.J. Perez, L.E. Diaz, M.F. Desimone, A new method for the preparation of biocompatible silica coated-collagen hydrogels, *J. Mater. Chem. B.* 1 (2013) 6283–6290.
- [46] L.I.F. Moura, A.M.A. Dias, E. Carvalho, H.C. de Sousa, Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment—A review, *Acta Biomater.* 9 (2013) 7093–7114.
- [47] E.A. Abou Neel, L. Bozec, J.C. Knowles, O. Syed, V. Mudera, R. Day, J.K. Hyun, Collagen — Emerging collagen based therapies hit the patient, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 429–456.
- [48] K. Tomihata, Y. Ikada, In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives, *Biomaterials.* 18 (1997) 567–575.
- [49] C. Chatelet, O. Damour, A. Domard, Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films, *Biomaterials.* 22 (2001) 261–268.
- [50] A. Chenite, C. Chaput, D. Wang, C. Combes, M.D. Buschmann, C.D. Hoemann, J.C. Leroux, B.L. Atkinson, F. Binette, A. Selmani, Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ, *Biomaterials.* 21 (2000)

2155–2161.

- [51] C. Shi, Y. Zhu, X. Ran, M. Wang, Y. Su, T. Cheng, Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine. This work was supported by “973” programs on severe trauma (NO. 1999054205 and NO. 2005CB522605) from the Ministry of Science and Technology of China., *J. Surg. Res.* 133 (2006) 185–192.
- [52] A.E. Pusateri, S.J. McCarthy, K.W. Gregory, R.A. Harris, L. Cardenas, A.T. McManus, C.W.J. Goodwin, Effect of a Chitosan-Based Hemostatic Dressing on Blood Loss and Survival in a Model of Severe Venous Hemorrhage and Hepatic Injury in Swine, *J. Trauma Acute Care Surg.* 54 (2003) 177–82.
- [53] X. Liu, Y. Chen, Q. Huang, W. He, Q. Feng, B. Yu, A novel thermo-sensitive hydrogel based on thiolated chitosan/hydroxyapatite/beta-glycerophosphate, *Carbohydr. Polym.* 110 (2014) 62–69.
- [54] J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, N.A. Peppas, R. Gurny, Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57 (2004) 19–34.
- [55] A.I.H. M.S. Mohy Eldin, E.A. Soliman, T.M. Tamer, Chitosan Modified Membranes for Wound Dressing Applications: Preparations, Characterization and Bio-Evaluation, *Trends Biomater. Artif. Organs.* 22 (2008) 158–168.
- [56] R. Jayakumar, M. Prabakaran, S. V Nair, H. Tamura, Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications, *Biotechnol. Adv.* 28 (2010) 142–150.
- [57] S.A. Agnihotri, N.N. Mallikarjuna, T.M. Aminabhavi, Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery, *J. Control. Release.* 100 (2004) 5–28.
- [58] J.-K. Francis Suh, H.W.T. Matthew, Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review, *Biomaterials.* 21 (2000) 2589–2598.
- [59] T. Ikeda, K. Ikeda, K. Yamamoto, H. Ishizaki, Y. Yoshizawa, K. Yanagiguchi, S. Yamada, Y. Hayashi, Fabrication and Characteristics of Chitosan Sponge as a Tissue Engineering Scaffold, *Biomed Res. Int.* 2014 (2014) ID 786892.

- [60] Q. Li, L. Ma, C. Gao, Biomaterials for in situ tissue regeneration: development and perspectives, *J. Mater. Chem. B.* 3 (2015) 8921–8938.
- [61] R. Jayakumar, M. Prabakaran, P.T. Sudheesh Kumar, S. V Nair, H. Tamura, Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications, *Biotechnol. Adv.* 29 (2011) 322–337.
- [62] R. Muzzarelli, G. Biagini, A. Pugnali, O. Filippini, V. Baldassarre, C. Castaldini, C. Rizzoli, Reconstruction of parodontal tissue with chitosan, *Biomaterials.* 10 (1989) 598–603.
- [63] A. Zulkifli, N.S.C., Ab Rahman, I., Mohamad, D. and Husein, A Green Sol-Gel Route for the Synthesis of Structurally Controlled Silica Particles from Rice Husk for Dental Composite Filler, *Ceram. Int.* 39 (2013) 4559–4567.
- [64] A.J. Salinas, M. Vallet-Regí, Bioactive ceramics: from bone grafts to tissue engineering, *RSC Adv.* 3 (2013) 11116–11131.
- [65] M. Vallet-Regí, I. Izquierdo-Barba, M. Colilla, Structure and functionalization of mesoporous bioceramics for bone tissue regeneration and local drug delivery, *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 370 (2012) 1400 LP-1421.
- [66] C.W. and J. Chang, A review of bioactive silicate ceramics, *Biomed. Mater.* 8 (2013) 32001.
- [67] D. Arcos, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, Promising trends of bioceramics in the biomaterials field, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 20 (2009) 447–455.
- [68] L.L. Hench, The future of bioactive ceramics, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26 (2015) 86.
- [69] H.A. · B. A.R., Biological Impact of Bioactive Glasses and Their Dissolution Products, *Front. Oral Biol.* 17 (2015) 22–32.
- [70] T. Kokubo, H.-M. Kim, M. Kawashita, Novel bioactive materials with different mechanical properties, *Biomaterials.* 24 (2003) 2161–2175.
- [71] J. Will, L.-C. Gerhardt, A.R. Boccaccini, Bioactive Glass-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering BT - Tissue Engineering III: Cell - Surface Interactions for Tissue Culture, in: C. Kasper, F. Witte, R. Pörtner (Eds.), Springer Berlin

- Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2012: pp. 195–226.
- [72] L.L. Hench, I. Thompson, Twenty-first century challenges for biomaterials, *J. R. Soc. Interface.* 7 (2010) S379–S391.
- [73] G.S. Alvarez, M.I.A. Echazu, C.E.O. and M.F. Desimone, Synthesis and Characterization of Ibandronate-Loaded Silica Nanoparticles and Collagen Nanocomposites, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 16 (2015) 661–667.
- [74] Y. Zhou, C. Wu, Y. Xiao, Silicate-based bioceramics for periodontal regeneration, *J. Mater. Chem. B.* 2 (2014) 3907–3910.
- [75] C.-C. Ho, S.-J. Ding, Novel SiO₂/PDA hybrid coatings to promote osteoblast-like cell expression on titanium implants, *J. Mater. Chem. B.* 3 (2015) 2698–2707.
- [76] W. Zhao, J. Chang, Preparation and characterization of novel tricalcium silicate bioceramics, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 73A (2005) 86–89.
- [77] O.M. Goudouri, E. Theodosoglou, E. Kontonasaki, J. Will, K. Chrissafis, P. Koidis, K.M. Paraskevopoulos, A.R. Boccaccini, Development of highly porous scaffolds based on bioactive silicates for dental tissue engineering, *Mater. Res. Bull.* 49 (2014) 399–404.
- [78] X. Wang, N. Ben Ahmed, G.S. Alvarez, M. V Tuttolomondo, C. Helary, M.F.D. and T. Coradin, Sol-gel Encapsulation of Biomolecules and Cells for Medicinal Applications, *Curr. Top. Med. Chem.* 15 (2015) 223–244.
- [79] D. Arcos, M. Vallet-Regí, Sol-gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration, *Acta Biomater.* 6 (2010) 2874–2888.
- [80] A. Carretero-Genevri, G.L. Drisko, D. Grosso, C. Boissiere, C. Sanchez, Mesoscopically structured nanocrystalline metal oxide thin films, *Nanoscale.* 6 (2014) 14025–14043.
- [81] T. Coradin, J. Livage, Aqueous Silicates in Biological Sol-Gel Applications: New Perspectives for Old Precursors, *Acc. Chem. Res.* 40 (2007) 819–826.
- [82] C. Sanchez, C. Boissiere, S. Cassaignon, C. Chaneac, O. Durupthy, M. Faustini, D. Grosso, C. Laberty-Robert, L. Nicole, D. Portehault, F. Ribot, L. Rozes, C. Sassoie, *Molecular Engineering of Functional Inorganic and Hybrid Materials,*

Chem. Mater. 26 (2014) 221–238.

- [83] S. Utech, A.R. Boccaccini, A review of hydrogel-based composites for biomedical applications: enhancement of hydrogel properties by addition of rigid inorganic fillers, *J. Mater. Sci.* 51 (2016) 271–310.
- [84] F. Zhao, D. Yao, R. Guo, L. Deng, A. Dong, J. Zhang, Composites of Polymer Hydrogels and Nanoparticulate Systems for Biomedical and Pharmaceutical Applications, *Nanomaterials*. 5 (2015) 2054–2130.
- [85] I.I.-B. and V.-R.M. Colilla M., Novel Biomaterials for Drug Delivery, *Expert Opin. Ther. Pat.* (2008) 639–656.
- [86] Z. Li, J.C. Barnes, A. Bosoy, J.F. Stoddart, J.I. Zink, Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 2590–2605.
- [87] G.S. Mebert, A.M.; Camporotondi, D.E.; Foglia, M.L.; Alvarez, M.F. Orihuela, P.L. S.; Diaz, L.E.; Desimone, Controlling the interaction between cells and silica nanoparticles., *J. Biomat. Tissue Engin.* 3 (2013) 108–121.
- [88] L. TIAN, C. PENG, Y. SHI, X. GUO, B. ZHONG, J. QI, G. WANG, Q. CAI, F. CUI, Effect of mesoporous silica nanoparticles on dentinal tubule occlusion: An in vitro study using SEM and image analysis, *Dent. Mater. J.* 33 (2014) 125–132.
- [89] S.P. Samuel, S. Li, I. Mukherjee, Y. Guo, A.C. Patel, G. Baran, Y. Wei, Mechanical properties of experimental dental composites containing a combination of mesoporous and nonporous spherical silica as fillers, *Dent. Mater.* 25 (2009) 296–301.
- [90] M.A. Massa, C. Covarrubias, M. Bittner, I.A. Fuentesvilla, P. Capetillo, A. Von Marttens, J.C. Carvajal, Synthesis of new antibacterial composite coating for titanium based on highly ordered nanoporous silica and silver nanoparticles, *Mater. Sci. Eng. C.* 45 (2014) 146–153.
- [91] M.D. Francis, The inhibition of calcium hydroxyapatite crystal growth by polyphosphonates and polyphosphates, *Calcif. Tissue Res.* 3 (1969) 151–162.

- [92] M.J. Russell, R.G.G.; Watts, N.B.; Ebetino, F.H.; Rogers, Mechanisms of action of bisphosphonates: Similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy., *Osteoporos. Int.* 19 (2008) 733–759.
- [93] P.P. Lehenkari, M. Kellinsalmi, J.P. Näpänkangas, K. V Ylitalo, J. Mönkkönen, M.J. Rogers, A. Azhayev, H.K. Väänänen, I.E. Hassinen, Further Insight into Mechanism of Action of Clodronate: Inhibition of Mitochondrial ADP/ATP Translocase by a Nonhydrolyzable, Adenine-Containing Metabolite, *Mol. Pharmacol.* 61 (2002) 1255 LP-1262.
- [94] E. van Beek, E. Pieterman, L. Cohen, C. Löwik, S. Papapoulos, Farnesyl Pyrophosphate Synthase Is the Molecular Target of Nitrogen-Containing Bisphosphonates, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264 (1999) 108–111.
- [95] E. V Giger, B. Castagner, J.-C. Leroux, Biomedical applications of bisphosphonates, *J. Control. Release.* 167 (2013) 175–188.
- [96] A. Ezra, G. Golomb, Administration routes and delivery systems of bisphosphonates for the treatment of bone resorption, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 42 (2000) 175–195.
- [97] C. Eberhardt, B. Habermann, S. Möller, M. Schwarz, F. Bauss, A.H.A. Kurth, The bisphosphonate ibandronate accelerates osseointegration of hydroxyapatite-coated cementless implants in an animal model, *J. Orthop. Sci.* 12 (2007) 61–66.
- [98] Y. Lalatonne, M. Monteil, H. Jouni, J.M. Serfaty, O. Sainte-Catherine, N. Lièvre, S. Kusmia, P. Weinmann, M. Lecouvey, L. Motte, Superparamagnetic Bifunctional Bisphosphonates Nanoparticles: A Potential MRI Contrast Agent for Osteoporosis Therapy and Diagnostic, *J. Osteoporos.* 2010 (2010) ID 747852.
- [99] G. Salzano, M. Marra, M. Porru, S. Zappavigna, A. Abbruzzese, M.I. La Rotonda, C. Leonetti, M. Caraglia, G. De Rosa, Self-assembly nanoparticles for the delivery of bisphosphonates into tumors, *Int. J. Pharm.* 403 (2011) 292–297.
- [100] J. Kolmas, M. Sobczak, E. Olędzka, G. Nałęcz-Jawecki, C. Dębek, Synthesis, Characterization and in Vitro Evaluation of New Composite Bisphosphonate Delivery Systems, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 16831–16847.

- [101] P. Dario, P.A. Maria, C. Federica, C. Emo, M. Albino, L.I. B., N. Nuno, R. Rui, Optimized electro- and wet-spinning techniques for the production of polymeric fibrous scaffolds loaded with bisphosphonate and hydroxyapatite, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 5 (2011) 253–263.
- [102] S. Samdancioglu, S. Calis, M. Sumnu, A. Atilla Hincal, Formulation and In Vitro Evaluation of Bisphosphonate Loaded Microspheres for Implantation in Osteolysis, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 32 (2006) 473–481.
- [103] U. Kettenberger, J. Ston, E. Thein, P. Procter, D.P. Pioletti, Does locally delivered Zoledronate influence peri-implant bone formation? – Spatio-temporal monitoring of bone remodeling in vivo, *Biomaterials.* 35 (2014) 9995–10006.
- [104] B. Peter, D.P. Pioletti, S. Laib, B. Bujoli, P. Pilet, P. Janvier, J. Guicheux, P.-Y. Zambelli, J.-M. Bouler, O. Gauthier, Calcium phosphate drug delivery system: influence of local zoledronate release on bone implant osteointegration, *Bone.* 36 (2005) 52–60.
- [105] E.A. Rayment, T.R. Dargaville, G.K. Shooter, G.A. George, Z. Upton, Attenuation of protease activity in chronic wound fluid with bisphosphonate-functionalised hydrogels, *Biomaterials.* 29 (2008) 1785–1795.
- [106] H. Bae, H. Chu, F. Edalat, J.M. Cha, S. Sant, A. Kashyap, A.F. Ahari, C.H. Kwon, J.W. Nichol, S. Manoucheri, B. Zamanian, Y. Wang, A. Khademhosseini, Development of functional biomaterials with micro- and nanoscale technologies for tissue engineering and drug delivery applications, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 8 (2014) 1–14.
- [107] E. Jeffries, Y. Wang, Biomimetic Micropatterned Multi-channel Nerve Guides by Templated Electrospinning, *Biotechnol. Bioeng.* 109 (2012) 1571–1582.
- [108] Z. You, X. Bi, X. Fan, Y. Wang, A functional polymer designed for bone tissue engineering, *Acta Biomater.* 8 (2012) 502–510.
- [109] N.. K. de Vries-van Melle, M.L.; Tihaya, M.S.; Kops, D.. W.J.L.M.; Mary Murphy, J.; Verhaar, J.A.N.; Alini, M.; Eglin, G.J.V.M. van Osch, Chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a simulated osteochondral environment is hydrogel dependent., *Eur. Cells* .

- Mater. 27 (2014) 112–123.
- [110] D.. Johnstone, B.; Alini, M.; Cucchiarini, M.; Dodge, G.R.; Eglin, C.E.. Guilak, F.; Madry, H.; Mata, A.; Mauck, R.L.; Semino, M.J. Stoddar, Tissue engineering for articular cartilage repair - The state of the art., *Eur. Cells Mater.* 25 (2012) 248–267.
- [111] T. Pirvu, S.B.G. Blanquer, L.M. Benneker, D.W. Grijpma, R.G. Richards, M. Alini, D. Eglin, S. Grad, Z. Li, A combined biomaterial and cellular approach for annulus fibrosus rupture repair, *Biomaterials.* 42 (2015) 11–19.
- [112] M.F. Desimone, C. Hélarý, I.B. Rietveld, I. Bataille, G. Mosser, M.-M. Giraud-Guille, J. Livage, T. Coradin, Silica–collagen bionanocomposites as three-dimensional scaffolds for fibroblast immobilization, *Acta Biomater.* 6 (2010) 3998–4004.
- [113] Q. Sandrine, C.G. J., A. Carole, B. Isabelle, H. Christophe, D.M. F., C. Thibaud, Influence of Silicification on the Structural and Biological Properties of Buffer-Mediated Collagen Hydrogels, *Adv. Eng. Mater.* 14 (2011) B51–B55.
- [114] M.L. Foglia, G.S. Alvarez, P.N. Catalano, A.M. Mebert, L.E. Diaz, T.C. and M.F. Desimone, Recent Patents on the Synthesis and Application of Silica Nanoparticles for Drug Delivery, *Recent Pat. Biotechnol.* 5 (2011) 54–61.
- [115] Q. He, J. Shi, Mesoporous silica nanoparticle based nano drug delivery systems: synthesis, controlled drug release and delivery, pharmacokinetics and biocompatibility, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 5845–5855.
- [116] K.C.-W. Wu, Y. Yamauchi, Controlling physical features of mesoporous silica nanoparticles (MSNs) for emerging applications, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 1251–1256.
- [117] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range, *J. Colloid Interface Sci.* 26 (1968) 62–69.
- [118] Z. Yang, M.; Wang, G.; Yang, Synthesis of hollow spheres with mesoporous silica nanoparticles shell, *Mater. Chem. Phys.* 111 (2008) 5–8.
- [119] S. Brunauer, P.H. Emmett, E. Teller, Adsorption of Gases in Multimolecular Layers, *J. Am. Chem. Soc.* 60 (1938) 309–319.

- [120] E.P. Barrett, L.G. Joyner, P.P. Halenda, The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms, *J. Am. Chem. Soc.* 73 (1951) 373–380.
- [121] S.. Alvarez, G.S.; Foglia, M. L.; Camporotondi, D.; Giorgeri, E.D. Desimone, M. F.; Luis, Zoledronate and related impurities analysis by capillary zone electrophoresis., *Curr. Anal. Chem.* 10 (2014) 231–234.
- [122] I. Bergman, R. Loxley, Two Improved and Simplified Methods for the Spectrophotometric Determination of Hydroxyproline., *Anal. Chem.* 35 (1963) 1961–1965.
- [123] G.S. Alvarez, C. Hélarý, A.M. Mebert, X. Wang, T. Coradin, M.F. Desimone, Antibiotic-loaded silica nanoparticle–collagen composite hydrogels with prolonged antimicrobial activity for wound infection prevention, *J. Mater. Chem. B.* 2 (2014) 4660.
- [124] P. Valerio, M.M. Pereira, A.M. Goes, M.F. Leite, The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production, *Biomaterials.* 25 (2004) 2941–2948.
- [125] G.. Q.-G. Casado-Díaz, A.; Santiago-Mora, R.; Dorado, J.M., Risedronate positively affects osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells., *Arch. Med. Res.* 44 (2013) 325–334.
- [126] F. von Knoch, C. Jaquierey, M. Kowalsky, S. Schaeren, C. Alabre, I. Martin, H.E. Rubash, A.S. Shanbhag, Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells, *Biomaterials.* 26 (2005) 6941–6949.
- [127] A. Neumann, A. Christel, C. Kasper, P. Behrens, BMP2-loaded nanoporous silica nanoparticles promote osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *RSC Adv.* 3 (2013) 24222–24230.
- [128] S.-W. Ha, M.N. Weitzmann, G.R. Beck, Bioactive Silica Nanoparticles Promote Osteoblast Differentiation through Stimulation of Autophagy and Direct Association with LC3 and p62, *ACS Nano.* 8 (2014) 5898–5910.
- [129] N. Tabary, F. Chai, N. Blanchemain, C. Neut, L. Pauchet, S. Bertini, E. Delcourt-Debruyne, H.F. Hildebrand, B. Martel, A chlorhexidine-loaded biodegradable

- cellulosic device for periodontal pockets treatment, *Acta Biomater.* 10 (2014) 318–329.
- [130] C.H. and M.F. Desimone, Recent Advances in Biomaterials for Tissue Engineering and Controlled Drug Delivery, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 16 (2015) 635–645.
- [131] M. dos S. Silva, N.L. Neto, S.A. da Costa, S.M. da Costa, T.M. Oliveira, R.C. de Oliveira, M.A.A.M. Machado, Biophysical and biological characterization of intraoral multilayer membranes as potential carriers: A new drug delivery system for dentistry, *Mater. Sci. Eng. C.* 71 (2017) 498–503.
- [132] W. Pichayakorn, P. Boonme, Evaluation of cross-linked chitosan microparticles containing metronidazole for periodontitis treatment, *Mater. Sci. Eng. C.* 33 (2013) 1197–1202.
- [133] C. Dhand, M. Venkatesh, V.A. Barathi, S. Harini, S. Bairagi, E. Goh Tze Leng, N. Muruganandham, K.Z.W. Low, M.H.U.T. Fazil, X.J. Loh, D.K. Srinivasan, S.P. Liu, R.W. Beerman, N.K. Verma, S. Ramakrishna, R. Lakshminarayanan, Bio-inspired crosslinking and matrix-drug interactions for advanced wound dressings with long-term antimicrobial activity, *Biomaterials.* 138 (2017) 153–168.
- [134] N.R.J. and Y. Wang, Drug Delivery Systems for Wound Healing, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 16 (2015) 621–629.
- [135] R. Lakshminarayanan, R. Sridhar, X.J. Loh, M. Nandhakumar, V.A. Barathi, M. Kalaipriya, J.L. Kwan, S.P. Liu, R.W. Beerman, S. Ramakrishna, Interaction of gelatin with polyenes modulates antifungal activity and biocompatibility of electrospun fiber mats, *Int. J. Nanomedicine.* 9 (2014) 2439–2458.
- [136] M. V Thomas, D.A. Puleo, Infection, Inflammation, and Bone Regeneration: a Paradoxical Relationship, *J. Dent. Res.* 90 (2011) 1052–1061.
- [137] G. Hajishengallis, The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota, *Mol. Oral Microbiol.* 29 (2014) 248–257.
- [138] S.C. Sundararaj, M. V Thomas, R. Peyyala, T.D. Dziubla, D.A. Puleo, Design of a Multiple Drug Delivery System Directed at Periodontitis, *Biomaterials.* 34 (2013) 8835–8842.

- [139] N. Tamaki, R. Cristina Orihuela-Campos, Y. Inagaki, M. Fukui, T. Nagata, H.-O. Ito, Resveratrol improves oxidative stress and prevents the progression of periodontitis via the activation of the Sirt1/AMPK and the Nrf2/antioxidant defense pathways in a rat periodontitis model, *Free Radic. Biol. Med.* 75 (2014) 222–229.
- [140] F.W.M.G. Muniz, S.B. Nogueira, F.L.V. Mendes, C.K. Rösing, M.M.S.M. Moreira, G.M. de Andrade, R. de S. Carvalho, The impact of antioxidant agents complimentary to periodontal therapy on oxidative stress and periodontal outcomes: A systematic review, *Arch. Oral Biol.* 60 (2015) 1203–1214.
- [141] T. Maruyama, T. Tomofuji, Y. Endo, K. Irie, T. Azuma, D. Ekuni, N. Tamaki, T. Yamamoto, M. Morita, Supplementation of green tea catechins in dentifrices suppresses gingival oxidative stress and periodontal inflammation, *Arch. Oral Biol.* 56 (2011) 48–53.
- [142] S.M. Nabavi, A. Marchese, M. Izadi, V. Curti, M. Daglia, S.F. Nabavi, Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy, *Food Chem.* 173 (2015) 339–347.
- [143] A. Marchese, I.E. Orhan, M. Daglia, R. Barbieri, A. Di Lorenzo, S.F. Nabavi, O. Gortzi, M. Izadi, S.M. Nabavi, Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature, *Food Chem.* 210 (2016) 402–414.
- [144] R. Gyawali, S.A. Ibrahim, Natural products as antimicrobial agents, *Food Control.* 46 (2014) 412–429.
- [145] M.E. Embuscado, Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review, *J. Funct. Foods.* 18 (2015) 811–819.
- [146] T. Jiang, R. James, S.G. Kumbar, C.T. Laurencin, Chapter 5 - Chitosan as a Biomaterial: Structure, Properties, and Applications in Tissue Engineering and Drug Delivery, in: S.G. Kumbar, C.T. Laurencin, M.B.T.-N. and S.B.P. Deng (Eds.), Elsevier, Oxford, 2014: pp. 91–113.
- [147] B. Fonseca-Santos, M. Chorilli, An overview of carboxymethyl derivatives of chitosan: Their use as biomaterials and drug delivery systems, *Mater. Sci. Eng. C.* 77 (2017) 1349–1362.
- [148] A. Aljawish, I. Chevalot, J. Jasniewski, J. Scher, L. Muniglia, Enzymatic synthesis

- of chitosan derivatives and their potential applications, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 112 (2015) 25–39.
- [149] E.M. Costa, S. Silva, C. Pina, F.K. Tavarina, M.M. Pintado, Evaluation and insights into chitosan antimicrobial activity against anaerobic oral pathogens, *Anaerobe.* 18 (2012) 305–309.
- [150] W.A. Sarhan, H.M.E. Azzazy, High concentration honey chitosan electrospun nanofibers: Biocompatibility and antibacterial effects, *Carbohydr. Polym.* 122 (2015) 135–143.
- [151] M. Hosseinejad, S.M. Jafari, Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.* 85 (2016) 467–475.
- [152] L. Zhao, Y. Hu, D. Xu, K. Cai, Surface functionalization of titanium substrates with chitosan–lauric acid conjugate to enhance osteoblasts functions and inhibit bacteria adhesion, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 119 (2014) 115–125.
- [153] X. He, K. Li, R. Xing, S. Liu, L. Hu, P. Li, The production of fully deacetylated chitosan by compression method, *Egypt. J. Aquat. Res.* 42 (2016) 75–81.
- [154] X. Li, Z. Yang, A. Zhang, The effect of neurotrophin-3/chitosan carriers on the proliferation and differentiation of neural stem cells, *Biomaterials.* 30 (2009) 4978–4985.
- [155] J.D. Bumgardner, V.P. Murali, H. Su, O.D. Jenkins, D. Velasquez-Pulgarin, J.A. Jennings, A. Sivashanmugam, R. Jayakumar, 4 - Characterization of chitosan matters, in: J.A. Jennings, J.D.B.T.-C.B.B.V. 1 Bumgardner (Eds.), Woodhead Publishing, 2017: pp. 81–114.
- [156] S. Ahmed, S. Ikram, Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing, *Achiev. Life Sci.* 10 (2016) 27–37.
- [157] P. Manivasagan, J. Oh, Marine polysaccharide-based nanomaterials as a novel source of nanobiotechnological applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 82 (2016) 315–327.
- [158] R. Zafar, K.M. Zia, S. Tabasum, F. Jabeen, A. Noreen, M. Zuber, Polysaccharide

- based bionanocomposites, properties and applications: A review, *Int. J. Biol. Macromol.* 92 (2016) 1012–1024.
- [159] N. Jain, G.K. Jain, S. Javed, Z. Iqbal, S. Talegaonkar, F.J. Ahmad, R.K. Khar, Recent approaches for the treatment of periodontitis, *Drug Discov. Today*. 13 (2008) 932–943.
- [160] N. Mati-Baouche, P.-H. Elchinger, H. de Baynast, G. Pierre, C. Delattre, P. Michaud, Chitosan as an adhesive, *Eur. Polym. J.* 60 (2014) 198–212.
- [161] W. Kanjanakawinkul, T. Rades, S. Puttipipatkachorn, T. Pongjanyakul, Nicotine–magnesium aluminum silicate microparticle surface modified with chitosan for mucosal delivery, *Mater. Sci. Eng. C*. 33 (2013) 1727–1736.
- [162] E. Russo, F. Selmin, S. Baldassari, C.G.M. Gennari, G. Caviglioli, F. Cilurzo, P. Minghetti, B. Parodi, A focus on mucoadhesive polymers and their application in buccal dosage forms, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 32 (2016) 113–125.
- [163] A.S. Pedro, E. Cabral-Albuquerque, D. Ferreira, B. Sarmento, Chitosan: An option for development of essential oil delivery systems for oral cavity care?, *Carbohydr. Polym.* 76 (2009) 501–508.
- [164] K. Halake, H.J. Kim, M. Birajdar, B.S. Kim, H. Bae, C. Lee, Y.J. Kim, S. Kim, S. Ahn, S.Y. An, S.H. Jung, J. Lee, Recently developed applications for natural hydrophilic polymers, *J. Ind. Eng. Chem.* 40 (2016) 16–22.
- [165] L. Shue, Z. Yufeng, U. Mony, Biomaterials for periodontal regeneration, *Biomater.* 2 (2012) 271–277.
- [166] Y. Zhou, C. Wu, X. Zhang, P. Han, Y. Xiao, The ionic products from bredigite bioceramics induced cementogenic differentiation of periodontal ligament cells via activation of the Wnt/ β -catenin signalling pathway, *J. Mater. Chem. B*. 1 (2013) 3380–3389.
- [167] M.C. Matesanz, J. Linares, I. Lilue, S. Sánchez-Salcedo, M.J. Feito, D. Arcos, M. Vallet-Regí, M.T. Portolés, Nanocrystalline silicon substituted hydroxyapatite effects on osteoclast differentiation and resorptive activity, *J. Mater. Chem. B*. 2 (2014) 2910–2919.
- [168] S.B. Qasim, S. Najeeb, R.M. Delaine-Smith, A. Rawlinson, I. Ur Rehman,

- Potential of electrospun chitosan fibers as a surface layer in functionally graded GTR membrane for periodontal regeneration, *Dent. Mater.* 33 (2017) 71–83.
- [169] T. Momose, H. Miyaji, A. Kato, K. Ogawa, T. Yoshida, E. Nishida, S. Murakami, Y. Kosen, T. Sugaya, M. Kawanami, Collagen Hydrogel Scaffold and Fibroblast Growth Factor-2 Accelerate Periodontal Healing of Class II Furcation Defects in Dog, *Open Dent. J.* 10 (2016) 347–359.
- [170] M.I.A. Echazu, M.V. Tuttolomondo, M.L. Foglia, A.M. Mebert, G.S. Alvarez, M.F. Desimone, Advances in collagen, chitosan and silica biomaterials for oral tissue regeneration: from basics to clinical trials, *J. Mater. Chem. B.* 4 (2016) 6913–6929.
- [171] M.S. BLOIS, Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical, *Nature.* 181 (1958) 1199.
- [172] V. Herzog, H.D. Fahimi, A new sensitive colorimetric assay for peroxidase using 3,3'-diaminobenzidine as hydrogen donor, *Anal. Biochem.* 55 (1973) 554–562.
- [173] H.P. Misra, I. Fridovich, The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 3170–3175.
- [174] F.S. Kittur, K. V Harish Prashanth, K. Udaya Sankar, R.N. Tharanathan, Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry, *Carbohydr. Polym.* 49 (2002) 185–193.
- [175] J. Ratto, T. Hatakeyama, R.B. Blumstein, Differential scanning calorimetry investigation of phase transitions in water/ chitosan systems, *Polymer (Guildf).* 36 (1995) 2915–2919.
- [176] L.S. Guinesi, É.T.G. Cavalheiro, The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples, *Thermochim. Acta.* 444 (2006) 128–133.
- [177] I.K. and E. Mendizábal, Swelling Properties of New Hydrogels Based on the Dimethyl Amino Ethyl Acrylate Methyl Chloride Quaternary Salt with Acrylic Acid and 2-Methylene Butane-1,4-Dioic Acid Monomers in Aqueous

- Solutions, *Mater. Sci. Appl.* 1 (2010) 162–167.
- [178] P. Li, J. Zhao, Y. Chen, B. Cheng, Z. Yu, Y. Zhao, X. Yan, Z. Tong, S. Jin, Preparation and characterization of chitosan physical hydrogels with enhanced mechanical and antibacterial properties, *Carbohydr. Polym.* 157 (2017) 1383–1392.
- [179] M.P. Licausi, A. Igual Muñoz, V. Amigó Borrás, Influence of the fabrication process and fluoride content on the tribocorrosion behaviour of Ti6Al4V biomedical alloy in artificial saliva, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 20 (2013) 137–148.
- [180] E. Brambilla, A. Ionescu, A. Mazzoni, M. Cadenaro, M. Gagliani, M. Ferraroni, F. Tay, D. Pashley, L. Breschi, Hydrophilicity of dentin bonding systems influences in vitro *Streptococcus mutans* biofilm formation, *Dent. Mater.* 30 (2014) 926–935.
- [181] A.P. Vieira Colombo, C.B. Magalhães, F.A.R.R. Hartenbach, R. Martins do Souto, C. Maciel da Silva-Boghossian, Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance, *Microb. Pathog.* 94 (2016) 27–34.
- [182] J. Durham, H.M. Fraser, G.I. McCracken, K.M. Stone, M.T. John, P.M. Preshaw, Impact of periodontitis on oral health-related quality of life, *J. Dent.* 41 (2013) 370–376.
- [183] X. Zhu, X. Jun Loh, Layer-by-layer assemblies for antibacterial applications, *Biomater. Sci.* 3 (2015) 1505–1518.
- [184] Z. Li, P.L. Chee, C. Owh, R. Lakshminarayanan, X.J. Loh, Safe and efficient membrane permeabilizing polymers based on PLLA for antibacterial applications, *RSC Adv.* 6 (2016) 28947–28955.
- [185] A.S. Hoffman, Stimuli-responsive polymers: Biomedical applications and challenges for clinical translation, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 10–16.
- [186] A. Gulzar, S. Gai, P. Yang, C. Li, M.B. Ansari, J. Lin, Stimuli responsive drug delivery application of polymer and silica in biomedicine, *J. Mater. Chem. B.* 3 (2015) 8599–8622.

- [187] G. Kocak, C. Tuncer, V. Butun, pH-Responsive polymers, *Polym. Chem.* 8 (2017) 144–176.
- [188] A. Popat, J. Liu, G.Q. (Max) Lu, S.Z. Qiao, A pH-responsive drug delivery system based on chitosan coated mesoporous silica nanoparticles, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 11173–11178.
- [189] S. Baliga, S. Muglikar, R. Kale, Salivary pH: A diagnostic biomarker, *J. Indian Soc. Periodontol.* 17 (2013) 461–465.
- [190] R. Vivek, V. Nipun Babu, R. Thangam, K.S. Subramanian, S. Kannan, pH-responsive drug delivery of chitosan nanoparticles as Tamoxifen carriers for effective anti-tumor activity in breast cancer cells, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 111 (2013) 117–123.
- [191] Z. Deng, Z. Zhen, X. Hu, S. Wu, Z. Xu, P.K. Chu, Hollow chitosan–silica nanospheres as pH-sensitive targeted delivery carriers in breast cancer therapy, *Biomaterials.* 32 (2011) 4976–4986.
- [192] R.S. Kalhapure, M. Jadhav, S. Rambharose, C. Mocktar, S. Singh, J. Renukuntla, T. Govender, pH-responsive chitosan nanoparticles from a novel twin-chain anionic amphiphile for controlled and targeted delivery of vancomycin, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 158 (2017) 650–657.
- [193] M.I. Alvarez Echazú, C.E. Olivetti, C. Anesini, C.J. Perez, G.S. Alvarez, M.F. Desimone, Development and evaluation of thymol-chitosan hydrogels with antimicrobial-antioxidant activity for oral local delivery, *Mater. Sci. Eng. C.* 81 (2017) 588–596.
- [194] M. Dziadek, K. Dziadek, A. Kopec, B. Zagrajczuk, K. Cholewa-Kowalska, Antioxidant activity of novel PCL/bioactive glass composites enriched with polyphenolic compounds extracted from fruits and leaves of sweet cherry (*Prunus avium* L.), *Mater. Lett.* 203 (2017) 28–31.
- [195] Z. Guo, D. Bo, P. He, H. Li, G. Wu, Z. Li, C. Zhou, Q. Li, Sequential controlled-released dual-drug loaded scaffold for guided bone regeneration in a rat fenestration defect model, *J. Mater. Chem. B.* 5 (2017) 7701–7710.
- [196] A.M. Mebert, C.J. Baglolle, M.F. Desimone, D. Maysinger, Nanoengineered silica: Properties, applications and toxicity, *Food Chem. Toxicol.* 109 (2017)

753–770.

- [197] P. Zhu, Y. Masuda, K. Koumoto, The effect of surface charge on hydroxyapatite nucleation, *Biomaterials*. 25 (2004) 3915–3921.
- [198] E. Könönen, P.S. Kumar, Chapter 53 - Bacteriology of Periodontal Diseases A2 - Tang, Yi-Wei, in: M. Sussman, D. Liu, I. Poxton, J.B.T.-M.M.M. (Second E. Schwartzman (Eds.), *Mol. Med. Microbiol.*, Academic Press, Boston, 2015: pp. 957–968.
- [199] F.J. Hughes, Chapter 34 - Periodontium and Periodontal Disease A2 - Vishwakarma, Ajaykumar, in: P. Sharpe, S. Shi, M.B.T.-S.C.B. and T.E. in D.S. Ramalingam (Eds.), *Stem Cell Biol. Tissue Eng. Dent. Sci.*, Academic Press, Boston, 2015: pp. 433–444.
- [200] E. Mazoniene, S. Joceviciute, J. Kazlauske, B. Niemeyer, J. Liesiene, Interaction of cellulose-based cationic polyelectrolytes with mucin, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 83 (2011) 160–164.
- [201] Ç. Kılıç, E.G. Güleç Peker, F. Acartürk, S.M.S. Kılıçaslan, Ş. Çoşkun Cevher, Investigation of the effects of local glutathione and chitosan administration on incisional oral mucosal wound healing in rabbits, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 112 (2013) 499–507.
- [202] A. Sosnik, J. das Neves, B. Sarmento, Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: A review, *Prog. Polym. Sci.* 39 (2014) 2030–2075.
- [203] S. Mansuri, P. Kesharwani, K. Jain, R.K. Tekade, N.K. Jain, Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system, *React. Funct. Polym.* 100 (2016) 151–172.
- [204] C. Anesini, S. Turner, E. Borda, G. Ferraro, J. Coussio, Effect of *Larrea divaricata* Cav. extract and nordihydroguaiaretic acid upon peroxidase secretion in rat submandibular glands, *Pharmacol. Res.* 49 (2004) 441–448.
- [205] A.R. and A.C. Davicino R, Peralta I, Martino R, Preventive Anti-Inflammatory Activity of an Aqueous Extract of *Larrea Divaricata* Cav. And Digestive and Hematological Toxicity, *Int J Pharm Sci Res.* 6 (2015) 3215–23.

- [206] M.E. Goleniowski, G.A. Bongiovanni, L. Palacio, C.O. Nuñez, J.J. Cantero, Medicinal plants from the “Sierra de Comechingones”, Argentina, *J. Ethnopharmacol.* 107 (2006) 324–341.
- [207] A. Vilela, M.L. Bolkovic, P. Carmanchahi, M. Cony, D. de Lamo, D. Wassner, Past, present and potential uses of native flora and wildlife of the Monte Desert, *J. Arid Environ.* 73 (2009) 238–243.
- [208] T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, *Biomaterials.* 27 (2006) 2907–2915.
- [209] C. Dawes, A.M.L. Pedersen, A. Villa, J. Ekström, G.B. Proctor, A. Vissink, D. Aframian, R. McGowan, A. Aliko, N. Narayana, Y.W. Sia, R.K. Joshi, S.B. Jensen, A.R. Kerr, A. Wolff, The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI, *Arch. Oral Biol.* 60 (2015) 863–874.
- [210] M.P.A. Carabajal, M.I. Isla, I.C. Zampini, Evaluation of antioxidant and antimutagenic activity of herbal teas from native plants used in traditional medicine in Argentina, *South African J. Bot.* 110 (2017) 258–265.
- [211] M.M. Grant, I.L.C. Chapple, 11 - Antioxidants and periodontal disease A2 - Wilson, Michael BT - Food Constituents and Oral Health, in: Woodhead Publ. Ser. Food Sci. Technol. Nutr., Woodhead Publishing, 2009: pp. 225–239.
- [212] S. Trivedi, N. Lal, Antioxidant enzymes in periodontitis, *J. Oral Biol. Craniofacial Res.* 7 (2017) 54–57.
- [213] S.M. San Miguel, L.A. Opperman, E.P. Allen, J. Zielinski, K.K.H. Svoboda, Bioactive polyphenol antioxidants protect oral fibroblasts from ROS-inducing agents, *Arch. Oral Biol.* 57 (2012) 1657–1667.
- [214] G. Kaur, R. Kathariya, S. Bansal, A. Singh, D. Shahakar, Dietary antioxidants and their indispensable role in periodontal health, *J. Food Drug Anal.* 24 (2016) 239–246.
- [215] I. Palaska, E. Papathanasiou, T.C. Theoharides, Use of polyphenols in periodontal inflammation, *Eur. J. Pharmacol.* 720 (2013) 77–83.
- [216] S. Granica, A. Kłębowska, M. Kosiński, J.P. Piwowarski, M.K. Dudek, S. Kaźmierski, A.K. Kiss, Effects of *Geum urbanum* L. root extracts and its

- constituents on polymorphonuclear leucocytes functions. Significance in periodontal diseases, *J. Ethnopharmacol.* 188 (2016) 1–12.
- [217] M. Kostić, D. Kitić, M.B. Petrović, T. Jevtović-Stoimenov, M. Jović, A. Petrović, S. Živanović, Anti-inflammatory effect of the *Salvia sclarea* L. ethanolic extract on lipopolysaccharide-induced periodontitis in rats, *J. Ethnopharmacol.* 199 (2017) 52–59.
- [218] P. Palmero, 15 - Ceramic–polymer nanocomposites for bone-tissue regeneration A2 - Liu, Huinan BT, in: *Nanocomposites Musculoskelet. Tissue Regen.*, Woodhead Publishing, Oxford, 2016: pp. 331–367.
- [219] A.F.K. Haffsah Iqbala, Moazzam Alib, Rabia Zeeshana, Zeeshan Mutahirb, Farasat Iqbala, Muhammad Azhar Hayat Nawaza, Lubna Shahzadia, Aqif Anwar Chaudhrya, Muhammad Yara, Shifang Luanc, Chitosan/hydroxyapatite (HA)/hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) spongy scaffolds-synthesis and evaluation as potential alveolar bone substitutes, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 160 (2017) 553–563.
- [220] J.L. Robinson, P. Brudnicki, H.H. Lu, 1.21 Polymer-Bioactive Ceramic Composites A2 - Ducheyne, Paul BT - *Comprehensive Biomaterials II*, in: *Compr. Biomater.*, Elsevier, Oxford, 2017: pp. 460–477.
- [221] N. Shadjou, M. Hasanzadeh, Bone tissue engineering using silica-based mesoporous nanobiomaterials:Recent progress, *Mater. Sci. Eng. C.* 55 (2015) 401–409.
- [222] J.A. Sowjanya, J. Singh, T. Mohita, S. Sarvanan, A. Moorthi, N. Srinivasan, N. Selvamurugan, Biocomposite scaffolds containing chitosan/alginate/nano-silica for bone tissue engineering, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 109 (2013) 294–300.
- [223] S. Pattnaik, S. Nethala, A. Tripathi, S. Saravanan, A. Moorthi, N. Selvamurugan, Chitosan scaffolds containing silicon dioxide and zirconia nano particles for bone tissue engineering, *Int. J. Biol. Macromol.* 49 (2011) 1167–1172.
- [224] Y. Xu, D. Gao, P. Feng, C. Gao, S. Peng, H. Ma, S. Yang, C. Shuai, A mesoporous silica composite scaffold: Cell behaviors, biomineralization and mechanical properties, *Appl. Surf. Sci.* 423 (2017) 314–321.

- [225] E.-C. Lönnroth, Toxicity of Medical Glove Materials: A Pilot Study, *Int. J. Occup. Saf. Ergon.* 11 (2005) 131–139.
- [226] P.A. Markov, N.S. Krachkovsky, E.A. Durnev, E.A. Martinson, S.G. Litvinets, S. V Popov, Mechanical properties, structure, bioadhesion, and biocompatibility of pectin hydrogels, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 105 (2017) 2572–2581.
- [227] B.R. Barrioni, S.M. de Carvalho, R.L. Oréface, A.A.R. de Oliveira, M. de M. Pereira, Synthesis and characterization of biodegradable polyurethane films based on HDI with hydrolyzable crosslinked bonds and a homogeneous structure for biomedical applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 52 (2015) 22–30.
- [228] H. Wang, J. Qian, F. Ding, Recent advances in engineered chitosan-based nanogels for biomedical applications, *J. Mater. Chem. B.* 5 (2017) 6986–7007.
- [229] S.-B. Park, E. Lih, K.-S. Park, Y.K. Joung, D.K. Han, Biopolymer-based functional composites for medical applications, *Prog. Polym. Sci.* 68 (2017) 77–105.
- [230] S. Michler, CHAPTER 8 - Biopolymers and Polymers for Medical Applications BT, in: *Atlas Polym. Struct.*, Hanser, 2016: pp. 485–526.
- [231] S. Arteaga, A. Andrade-Cetto, R. Cárdenas, *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid, *J. Ethnopharmacol.* 98 (2005) 231–239.
- [232] Y. Zhang, C. Huang, J. Chang, Ca-Doped mesoporous SiO₂/dental resin composites with enhanced mechanical properties, bioactivity and antibacterial properties, *J. Mater. Chem. B.* (2018).
- [233] L. Hu, Y. Sun, Y. Wu, Advances in chitosan-based drug delivery vehicles, *Nanoscale.* 5 (2013) 3103–3111.
- [234] A. Ali, S. Ahmed, A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery, *Int. J. Biol. Macromol.* 109 (2018) 273–286.
- [235] S.M. Ahsan, M. Thomas, K.K. Reddy, S.G. Sooraparaju, A. Asthana, I. Bhatnagar, Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering, *Int. J. Biol. Macromol.* (2017).
- [236] M.A. Barbosa, I.C. Gonçalves, P.M.D. Moreno, R.M. Gonçalves, S.G. Santos, A.P.

- Pêgo, I.F. Amaral, 2.13 Chitosan A2 - Ducheyne, Paul BT - *Comprehensive Biomaterials II*, in: Elsevier, Oxford, 2017: pp. 279–305.
- [237] J. Xu, S. Strandman, J.X.X. Zhu, J. Barralet, M. Cerruti, Genipin-crosslinked catechol-chitosan mucoadhesive hydrogels for buccal drug delivery, *Biomaterials*. 37 (2015) 395–404.
- [238] S. Pistone, F.M. Goycoolea, A. Young, G. Smistad, M. Hiorth, Formulation of polysaccharide-based nanoparticles for local administration into the oral cavity, *Eur. J. Pharm. Sci.* 96 (2017) 381–389.
- [239] C. Tang, Y.-X. Guan, S.-J. Yao, Z.-Q. Zhu, Preparation of ibuprofen-loaded chitosan films for oral mucosal drug delivery using supercritical solution impregnation, *Int. J. Pharm.* 473 (2014) 434–441.
- [240] D.K. Khajuria, O.N. Patil, D. Karasik, R. Razdan, Development and evaluation of novel biodegradable chitosan based metformin intrapocket dental film for the management of periodontitis and alveolar bone loss in a rat model, *Arch. Oral Biol.* 85 (2018) 120–129.
- [241] V.K. Mourya, N.N. Inamdar, Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore, *React. Funct. Polym.* 68 (2008) 1013–1051.
- [242] J. Yang, K. Luo, D. Li, S. Yu, J. Cai, L. Chen, Y. Du, Preparation, characterization and in vitro anticoagulant activity of highly sulfated chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.* 52 (2013) 25–31.
- [243] B. Shi, H. Zhang, Z. Shen, J. Bi, S. Dai, Developing a chitosan supported imidazole Schiff-base for high-efficiency gene delivery, *Polym. Chem.* 4 (2013) 840–850.
- [244] A.F. Martins, S.P. Facchi, H.D.M. Follmann, A.G.B. Pereira, A.F. Rubira, E.C. Muniz, Antimicrobial Activity of Chitosan Derivatives Containing N-Quaternized Moieties in Its Backbone: A Review, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 20800–20832.
- [245] N.N. Shah, N. Soni, R.S. Singhal, Modification of proteins and polysaccharides using dodecenyl succinic anhydride: Synthesis, properties and applications—A review, *Int. J. Biol. Macromol.* 107 (2018) 2224–2233.

- [246] L. Ren, Q. Wang, X. Yan, J. Tong, J. Zhou, X. Su, Dual modification of starch nanocrystals via crosslinking and esterification for enhancing their hydrophobicity, *Food Res. Int.* 87 (2016) 180–188.
- [247] H. Wang, P.A. Williams, C. Senan, Synthesis, characterization and emulsification properties of dodecyl succinic anhydride derivatives of gum Arabic, *Food Hydrocoll.* 37 (2014) 143–148.
- [248] L. Ren, Z. Dong, M. Jiang, J. Tong, J. Zhou, Hydrophobization of starch nanocrystals through esterification in green media, *Ind. Crops Prod.* 59 (2014) 115–118.
- [249] E. Macri, F. Lifshitz, C. Ramos, R. Orzuza, O. Costa, V. Zago, P. Boyer, S. Friedman, Atherogenic cholesterol-rich diet and periodontal disease, *Arch. Oral Biol.* 59 (2014) 679–686.
- [250] N.R. Council, *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition*, The National Academies Press, Washington, DC, 2011.
- [251] J.C. Vacas, M. I., Amer, M. , Chiarenza, A. P., Luchelli, M. A., Mandalunis, P. M. and Elverdin, Influence of Submandibulectomy on Alveolar Bone Loss in Rats, *J. Periodontol.* 79 (2008) 1075–1080.
- [252] S. Veigel, E.-M. Lems, G. Grüll, C. Hansmann, T. Rosenau, T. Zimmermann, W. Gindl-Altmutter, Simple Green Route to Performance Improvement of Fully Bio-Based Linseed Oil Coating Using Nanofibrillated Cellulose, *Polymers (Basel)*. 9 (2017).
- [253] H.Y. Zhou, L.J. Jiang, P.P. Cao, J.B. Li, X.G. Chen, Glycerophosphate-based chitosan thermosensitive hydrogels and their biomedical applications, *Carbohydr. Polym.* 117 (2015) 524–536.
- [254] J. Milovanova-Palmer, B. Pendry, Is there a role for herbal medicine in the treatment and management of periodontal disease?, *J. Herb. Med.* (2018).
- [255] E. Sanchez-Rexach, I. Martínez de Arenaza, J.-R. Sarasua, E. Meaurio, Antimicrobial poly(ϵ -caprolactone)/thymol blends: Phase behavior, interactions and drug release kinetics, *Eur. Polym. J.* 83 (2016) 288–299.
- [256] M. Michalska-Sionkowska, M. Walczak, A. Sionkowska, Antimicrobial activity

- of collagen material with thymol addition for potential application as wound dressing, *Polym. Test.* 63 (2017) 360–366.
- [257] G.M. Tartaglia, N. Gagliano, L. Zarbin, G. Tolomeo, C. Sforza, Antioxidant capacity of human saliva and periodontal screening assessment in healthy adults, *Arch. Oral Biol.* 78 (2017) 34–38.
- [258] N.A. Ghallab, Diagnostic potential and future directions of biomarkers in gingival crevicular fluid and saliva of periodontal diseases: Review of the current evidence, *Arch. Oral Biol.* 87 (2018) 115–124.
- [259] A. Ozkan, A. Erdogan, A Comparative Study of the Antioxidant/Prooxidant Effects of Carvacrol and Thymol at Various Concentrations on Membrane and DNA of Parental and Drug Resistant H1299 Cells, 2012.
- [260] S. Tao, S. Gao, Y. Zhou, M. Cao, W. Xie, H. Zheng, L. Fan, Preparation of carboxymethyl chitosan sulfate for improved cell proliferation of skin fibroblasts, *Int. J. Biol. Macromol.* 54 (2013) 160–165.
- [261] J. Jacob, J.T. Haponiuk, S. Thomas, S. Gopi, Biopolymer based nanomaterials in drug delivery systems: A review, *Mater. Today Chem.* 9 (2018) 43–55.
- [262] S.R. Soni, A. Ghosh, Chapter 9 - Grafting Onto Biopolymers: Application in Targeted Drug Delivery, in: V.K.B.T.-B.G. Thakur (Ed.), Elsevier, 2018: pp. 335–389.
- [263] P.K. M. Vert, Y. Doi, K.-H. Hellwich, M. Hess, P. Hodge, M.R. and F. Schue, Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012), *Pure Appl. Chem.*, 2012, p. 377. (2012) 377.
- [264] L. Catalfamo, E. Belli, C. Nava, E. Mici, A. Calvo, B. D'Alessandro, F.S. De Ponte, Bioengineering in the oral cavity: our experience, *Int. J. Nanomedicine.* 8 (2013) 3883–3886.
- [265] J. Liu, J.J. Mao, L. Chen, Epithelial–Mesenchymal Interactions as a Working Concept for Oral Mucosa Regeneration, *Tissue Eng. Part B. Rev.* 17 (2011) 25–31.
- [266] C.A. de Souza Costa, J. Hebling, D.L.S. Scheffel, D.G.S. Soares, F.G. Basso, A.P.D. Ribeiro, Methods to evaluate and strategies to improve the

- biocompatibility of dental materials and operative techniques, *Dent. Mater.* 30 (2014) 769–784.
- [267] F. Croisier, C. Jérôme, Chitosan-based biomaterials for tissue engineering, *Eur. Polym. J.* 49 (2013) 780–792.
- [268] R.A. García-Muñoz, V. Morales, M. Linares, P.E. González, R. Sanz, D.P. Serrano, Influence of the structural and textural properties of ordered mesoporous materials and hierarchical zeolitic supports on the controlled release of methylprednisolone hemisuccinate, *J. Mater. Chem. B.* 2 (2014) 7996–8004.
- [269] C.D. Parrish LC, Miyamoto T, Fong N, Mattson JS, Non-bioabsorbable vs. bioabsorbable membrane: assessment of their clinical efficacy in guided tissue regeneration technique. A systematic review., *J. Oral Sci.* 51 (2009) 383–400.
- [270] F.A. J. Abtahi, and P.A. O. Sandberg, Effect of Local vs. Systemic Bisphosphonate Delivery on Dental Implant Fixation in a Model of Osteonecrosis of the Jaw, *J. Dent. Res.* 92 (2013) 279–283.
- [271] C.K. Kouidhi B, Al Qurashi YM, Drug resistance of bacterial dental biofilm and the potential use of natural compounds as alternative for prevention and treatment, *Microb. Pathog.* 80 (2015) 39–49.

CAPÍTULO 8:
APÉNDICE

Resumen de 200 palabras en inglés

Different materials have distinct surface and bulk characteristics; each of them potentially useful for the treatment of a particular wound or disease. By studying those materials, the reader will have a broad panorama of the possibilities a particular material can offer, regarding its ability to support tissue regeneration or local drug delivery. This thesis covers recent advances made towards the development of biomaterials aimed to support regenerative processes and drug delivery. Indeed, we highlight ultrastructure, rheological properties, cytocompatibility, release kinetics and biological properties of different biomaterials for a specific biomedical application. In this context, the focus is made on collagen, chitosan and silica which are key representatives of a protein, a polysaccharide and an inorganic material usually employed as biomaterials. Particularly, this thesis presents an overview of their potential therapeutics in the treatment of disorders within the oral mucosa and tooth supporting tissues. Finally, the importance of material characterization, *in vitro* and *in vivo* studies as an adequate guidance for biomaterial design and development is highlighted.

Resumen de 200 palabras en castellano

Diferentes materiales tienen distintas características de superficie y volumen; cada una de ellas es potencialmente útil para el tratamiento de una herida o enfermedad en particular. Al estudiar esos materiales, el lector tendrá un amplio panorama de las posibilidades que un material en particular puede ofrecer, con respecto a su capacidad para respaldar la regeneración tisular o la administración de fármacos local. Esta tesis cubre los avances recientes del desarrollo de biomateriales destinados a apoyar los procesos regenerativos y la administración de fármacos. De hecho, destacamos la ultraestructura, las propiedades reológicas, la citocompatibilidad, la cinética de liberación y las propiedades biológicas de diferentes biomateriales para una aplicación biomédica específica. En este contexto, la atención se centra en el colágeno, el quitosano y la sílica, que son representantes clave de una proteína, un polisacárido y un material inorgánico que se emplean habitualmente como biomateriales. Particularmente, esta tesis presenta una visión general de su potencial en la terapéutica para el tratamiento de enfermedades que comprometen la mucosa oral y los tejidos de soporte del diente. Finalmente, se

destaca la importancia de la caracterización del material, estudios *in vitro* e *in vivo* como una guía adecuada para el diseño y desarrollo de biomateriales.

Resumen de 900 palabras en castellano

Diferentes materiales tienen distintas características de superficie y volumen; cada una de ellas es potencialmente útil para el tratamiento de una herida o enfermedad en particular. Esta tesis cubre los avances recientes del desarrollo de biomateriales destinados a ayudar procesos regenerativos y la administración local de fármacos para enfermedades orales. De hecho, destacamos la ultraestructura, las propiedades reológicas, la citocompatibilidad, la cinética de liberación y las propiedades biológicas de diferentes biomateriales para una aplicación biomédica específica. En este contexto, la atención se centra en el colágeno, el quitosano y la sílica, que son representantes clave de una proteína, un polisacárido y un material inorgánico que se emplean habitualmente como biomateriales ofreciendo una visión general de su potencial en la terapéutica para el tratamiento de enfermedades que comprometen la mucosa oral y los tejidos de soporte del diente.

En el primer capítulo, se evaluaron nanopartículas de sílica no porosas, modificadas con grupos amino y mesoporosas, como carriers de ibandronato sódico. Las nanopartículas se caracterizaron por SEM, TEM, DLS, porosidad y por su capacidad para incorporar ibandronato, así como por el perfil de liberación. Las mesoporosas y modificadas con grupos amino mostraron niveles más altos de incorporación de fármaco, $44,68 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ y $28,90 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente. La cinética de liberación de los dos tipos de partículas fue similar siguiendo una cinética de primer orden. Sin embargo, cuando las partículas mesoporosas se incorporaron en hidrogeles de colágeno tuvieron una liberación sostenida durante más de 10 días. La biocompatibilidad de las partículas mesoporosas frente a células SAOS-2 también se evaluó mediante el ensayo de MTT donde se observó un aumento en la viabilidad celular para concentraciones inferiores a $0,6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de partículas y una disminución para concentraciones superiores a $1,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Además, cuando estas partículas fueron incubadas con células mesenquimales podrían tener la capacidad de promover la diferenciación de las células a causa del aumento significativo de la actividad de la fosfatasa alcalina.

Hoy en día, los sistemas de administración locales de antimicrobianos, antioxidantes y antiinflamatorios tienen un desarrollo creciente, para evitar los efectos secundarios y son de fácil administración. En el segundo capítulo, hidrogeles de quitosano se

evalúan como un andamio biodegradable y como carrier de un compuesto con propiedades antioxidantes-antimicrobianas llamado timol. A lo largo del estudio, se presenta el perfil de hinchamiento, las propiedades viscoelásticas y el análisis térmico resaltando sus ventajas para una aplicación biomédica. Además, los resultados *in vitro* obtenidos indican que los hidrogeles de quitosano son biocompatibles cuando se exponen a fibroblastos [3T3], exhiben actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* por 72 hs y actividad antioxidante por 24 hs. Estas son propiedades deseables para un sistema de administración local para una terapia dual antimicrobiana-antioxidante para la enfermedad periodontal.

El estudio detallado de los biomateriales es mandatorio para comprender sus aplicaciones biomédicas. Particularmente, los biopolímeros mucoadhesivos como el quitosano (chi) y la carboximetilcelulosa (CMC) se han convertido en biomateriales interesantes por su biocompatibilidad y no toxicidad para la administración de fármacos en la mucosa oral. En el tercer capítulo, se desarrollaron compósitos de biopolímero-sílica sensibles al pH (Chi-SiO₂, Chi-CMC-SiO₂). Estos dos tipos de compósitos presentaron un perfil de hinchamiento diferente debido al pH. Además, los compósitos se cargaron con extracto de *Larrea divaricata* Cav. (Ld), una planta sudamericana que presenta propiedades antioxidantes adecuadas para el tratamiento de enfermedades gingivoperiodontales. Los compósitos Chi-CMC-SiO₂ mostraron una incorporación más alta y alcanzaron el 100% de la liberación de extracto en casi 4 días, conservando las propiedades antioxidantes. Se señaló el comportamiento térmico y el perfil de hinchamiento para mostrar la interacción agua-compósito y, por lo tanto, para evaluar su mucoadhesividad. Además, se evaluó la citotoxicidad con fibroblastos [3T3], que muestra que en ambos compósitos la adición del extracto de Ld aumento de la proliferación de fibroblastos. Por último, los estudios preliminares de biomineralización *in vitro*. El análisis SEM-EDS indicó que solo el compósito chi-SiO₂ puede proporcionar un entorno para una posible biomineralización, mientras que la adición de CMC a los compósitos desalentó la acumulación de calcio. En conclusión, el desarrollo de compósitos bioactivos podría promover la generación de tejido periodontal dañado a lo largo de la enfermedad periodontal y la presencia de nanopartículas de sílica podría proporcionar un ambiente para la biomineralización.

El uso de polímeros como carriers de bioactivos ha cobrado importancia últimamente por su gran versatilidad debido a las modificaciones químicas que pueden realizarse. Éstas pueden traducirse en cambios fisicoquímicos relevantes para el desarrollo de sistemas de liberación estímulo-responsivos o con una liberación sostenida. En particular, la modificación de biopolímeros podría tener relevancia por su conocida biocompatibilidad y no toxicidad. En el cuarto capítulo, sintetizamos hidrogeles de quitosano modificados químicamente con DDSA (anhídrido dodecenilsuccínico) y evaluamos el impacto en la incorporación de un principio activo poco soluble en agua llamado timol, en el perfil de liberación y en las propiedades biológicas. Caracterizamos los hidrogeles mediante SEM, FTIR, ¹³C RMN y también su reología. Los hidrogeles DDSA-quitosano presentaron actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* por 2 días y actividad antioxidante por 5 días. Esto es congruente con la liberación de timol, que duró 7 días. Los hidrogeles DDSA-quitosano fueron reológicamente más resistentes y su citocompatibilidad fue menor en comparación a los hidrogeles no modificados. Finalmente, realizamos un estudio preliminar *in vivo* en un modelo periodontitis inducida por ligadura donde pudimos observar por medidas histomorfométricas que el daño periodontal fue mayor en el grupo DDSA-quitosano que el grupo timol-quitosano.